Aus der Kinderuniversitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Josef Ströder

Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten von alkalischer Phosphatase und Calcium-abhängiger Adenosintriphosphatase in der gereinigten Bürstensaumfraktion des Duodenums von Diphenylhydantoin-behandelten Ratten. Ein Beitrag zur Pathogenese der Osteopathia antiepileptica.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Christine Mergner

aus Schernfeld Kreis Eichstätt

1980

Würzburg, den 14.12.1979

Aus der Kinderuniversitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Josef Ströder

Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten von alkalischer Phosphatase und Calcium-abhängiger Adenosintriphosphatase in der gereinigten Bürstensaumfraktion des Duodenums von Diphenylhydantoin-behandelten Ratten. Ein Beitrag zur Pathogenese der Osteopathia antiepileptica.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Christine Mergner

aus Schernfeld Kreis Eichstätt

Würzburg, den 14.12.1979

Referent: Professor Dr. med. h.c. J. Ströder

Korreferent: Professor Dr. med. K. Sandhage

Dekan: Professor Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 3.6.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung
A.1. Vorstellung des Themas
A.2. Problemdarstellung unter klinisch-diagnostischem Aspekt

B. Theoretischer Überblick: Calciumstoffwechsel Antiepileptika-Rachitis

B.1. Regulationsmechanismen des Calciumstoffwechsels
B.1,1 Vitamin D-Stoffwechsel
B.1.1.2. Historischer Überblick
B.1.1.3. Aufbau -und Umbaustufen des Vitamin D_3 = Cholecalciferol und Darstellung der Regulationsmechanismen in Leber und Niere nach SWOBODA (1976)
B.1.1.4. Vitamin D-Bedarf
B.1.1.5. Vitamin D-Stoffwechsel und seine Regulation
B.1.1.6. Wirkungsweise von 1,25 $(OH)_2$-D_3

B.2. Modellvorstellungen zum intestinalen Calciumtransport
B.2.1. Schema zur Calciumresorption an der intestinalen Schleimhautzelle nach PIAZOLO (1973)
B.2.2. Mögliche Resorptionsmechanismen im Calciumtransport durch die Mucosazelle
B.2.3. Mögliche funktionelle Komponenten im aktiven Calciumtransport
B.2.4. Die Rolle des Ca-ATP-ase-alkalische Phosphatase-Systems im intestinalen Calciumtransport

B.3. Die " Antiepileptica-Rachitis "
B.3.1. Historischer Überblick
B.3.2. Hypothesen zur Pathogenese der Antiepileptica-Rachitis bzw. Osteopathia Antiepileptica
B.3.2.1. Multifaktorielle Pathogenese: Schema nach SCHAEFER (1973)
B.3.2.2. Enzyminduktionstheorie

B.3.2.3. Das intestinale Calciumtransportsystem als indirekter Angriffspunkt für antiepileptische Medikamente
B.3.3. Das Antiepileptikum Phenhydan (DPH)
B.3.3.1. Chemisch, physikalische Eigenschaften
B.3.3.2. Pharmakokinetik
3.3.2.1. Resorption
3.3.2.2. Plasmaeiweißbindung
3.3.2.3. Verteilung
3.3.2.4. Halbwertzeit
3.3.2.5. Ausscheidung
B.3.3.3. Wirkungsmechanismus von DPH
B.3.3.4. Nebenwirkungen von DPH genereller Art
B.3.3.5. Störung des intestinalen Calciumtransportes durch DPH (spezielle Nebenwirkung von DPH)

C. Experimenteller Teil
Untersuchung der direkten Wirkung von DPH auf Enzymsysteme der duodenalen Ca-Resorption an Ratten
C.1. Tierzucht
1.1. Anzahl, Alter der Versuchstiere, DPH-Verabreichung, Tierhaltung
1.2. Verhaltensbeobachtung an den DPH-behandelten Ratten
C.2. Versuchsaufbau
2.1. Methode zur Gewinnung der gereinigten Bürstensaumfraktion des Rattenduodenums
2.2. Enzymatische Bestimmungen
2.2.1. Bestimmung der Mg, Ca-abhängigen ATP-ase-Aktivität in der gereinigten Bürstensaumfraktion
2.2.2. Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase
2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration in der gereinigten Bürstensaumfraktion

D. Ergebnisse und Auswertung

D.1. Angewandte statistische Verfahren

D.2. Untersuchte Parameter

D.3. Statistische Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse

3.1. Mittelwerte der gemessenen Enzymaktivitäten

3.2. Prüfung auf Normalität

3.3. Graphische Darstellung der Verteilung der einzelnen Meßgrößen

3.4. Signifikanzprüfung der Unterschiedlichkeit der Mittelwerte von DPH-behandeltem und Kontrollkollektiv

3.5. Rangkorrelationsteste

E. Diskussion

E.1. Problematik der tierexperimentellen Versuchsdurchführung an Ratten zum Beweis einer "DPH-Rachitis"

1.1. Äußere Veränderungen bei den DPH-behandelten Ratten als Hinweis auf eine rachitische Symptomatik.

1.2. Literaturbeispiele für laborchemische und radiologische Veränderungen bei Kindern unter antiepileptischer Langzeittherapie als Hinweis auf eine Antiepileptica-Rachitis

1.3. Mögliche Nebenwirkungen durch Gabe von DPH in Äthanollösung

E.2. Kritische Betrachtung zu Versuchsaufbau und Ergebnissen

2.1. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme alkalische Phosphatase und Mg, Ca-abhängige Phosphatase in der gereinigten intestinalen Bürstensaumfraktion

2.2. Ergebnisse der Rangkorrelationsuntersuchung

2.3. Hypothetische alkalische Phosphatase und Mg, Ca-abhängige ATP-ase im intestinalen Calciumtransport

2.4. In vitro Hemmversuche mit Ouabain (g-Strophantin)

E.3. Die Ergebnisse im Vergleich zu einzelnen Hypothesen über die Pathogenese der Antiepileptica-Osteomalazie

E.4. Zusammenfassung der möglichen Interaktion von DPH mit dem intestinalen Calciumtransport

F. Zusammenfassung
G. Anhang
G.1. Einzelergebnisse
G.2. Abkürzungen
H. Literaturverzeichnis

A. Einleitung

A.1. Vorstellung des Themas

Die vorliegende Arbeit berichtet über die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten alkalischer Phosphatasen und Calcium-abhängiger ATP-asen in gereinigten Bürstensaumfraktionen des Duodenums DPH (Diphenylhydantoin)-behandelter Ratten im Vergleich zu Kontrollratten, die nur mit dem Lösungsmittel ohne DPH behandelt wurden.
Als hypothetische Voraussetzung (MELANCON u. DE LUCA 1970 und SEIFERT 1975) nehmen wir an, daß diese Enzyme eine energieliefernde Funktion bei der initialen Calcium-Aufnahme durch die Mucosazelle des Duodenums haben. Wir wollen feststellen, ob durch eine in-vivo-Verabreichung von DPH auch bereits nach kurzzeitiger Behandlung eine Verminderung der spezifischen Aktivität dieser Enzyme beobachtet werden kann.

A.2. Problemstellung unter klinisch-diagnostischem Aspekt

Es ist bekannt, daß durch eine antiepileptische Langzeitbehandlung bei Kindern das Bild einer Rachitis, bei Erwachsenen einer Osteomalazie hervorgerufen werden kann. In den letzten Jahren erschienen darüber zahlreiche klinische Veröffentlichungen (CROSLEY 1975, LÜCKING 1973, LUCKERT 1975, LIFSHITZ 1973, TOLMAN 1975, MELSEN 1977, WINNACKER 1977).
Für den Kliniker liegt das Problem der Früherkennung einer sich anbahnenden Antiepileptika-Rachitis bzw. Osteomalazie in den diagnostischen Möglichkeiten: Bei radiologischen Anzeichen der Rachitis in Form von Knochendemineralisationen und epiphysären Veränderungen ist eine manifeste Störung des Calciumstoffwechsels bereits vorhanden. Sensitivere diagnostische Methoden sind Messungen der Serumkonzentrationen der Vitamin-D-Metaboliten (RIBOT 1976) und Bestimmungen der

Knochenmasse durch Photon-Absorptions-Dichtemessungen (HAHN 1976, KRAUSE 1977). Die bekannteste Erklärung zur Pathogenese der Antiepileptika-Rachitis bzw. Osteomalazie ist die Enzyminduktionstheorie (DENT et al 1970), nach der primär ein Mangel an aktiven Vitamin-D-Metaboliten für die intestinale Calcium-Resorptionsstörung verantwortlich gemacht wird.
Weit weniger bekannt und erforscht ist die Möglichkeit einer direkten inhibitorischen Wirkung von antiepileptischen Medikamenten auf den intestinalen Calcium-Transport noch bevor eine Veränderung des Vitamin-D-Status in Erscheinung tritt.

Die vorliegende Untersuchung stellt einen Beitrag dar zu der bei SCHAEFFER (1973) vertretenen These, daß Antiepileptica, speziell DPH, die Calcium-Resorption im Duodenum beeinträchtigen, noch ehe eine auffällige rachitische Symptomatik mit den bisher bekannten diagnostischen Verfahren festzustellen ist.

Biochemische Enzymanalysen aus Darmbiopsien könnten eine Anregung für weitere diagnostische Möglichkeiten zur Früherkennung einer Antikonvulsiva-Osteomalazie darstellen.

B. Theoretischer Überblick: Calcium-Stoffwechsel Antiepileptika-Rachitis

B.1. Regulationsmechanismen des Calcium-Stoffwechsels

Der Serum-Calciumspiegel ist eine der am strengsten kontrollierten und stabilisierten biologischen Konstanten. Täglich werden vom Erwachsenen etwa ein Gramm Calcium mit der Nahrung aufgenommen. In der Kindheit liegt der Calciumbedarf, bedingt durch das Skelettwachstum, höher. Für die Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase im Blut sind intestinale Calciumabsorption und Calciummobilisierung aus dem Knochen entscheidende Faktoren, wobei die metabolische Wirkung der Vitamin-D-Produkte als ein wesentlicher Regulationsmechanismus angesehen wird. (Siehe S. 9 Schema nach SANDRITTER)

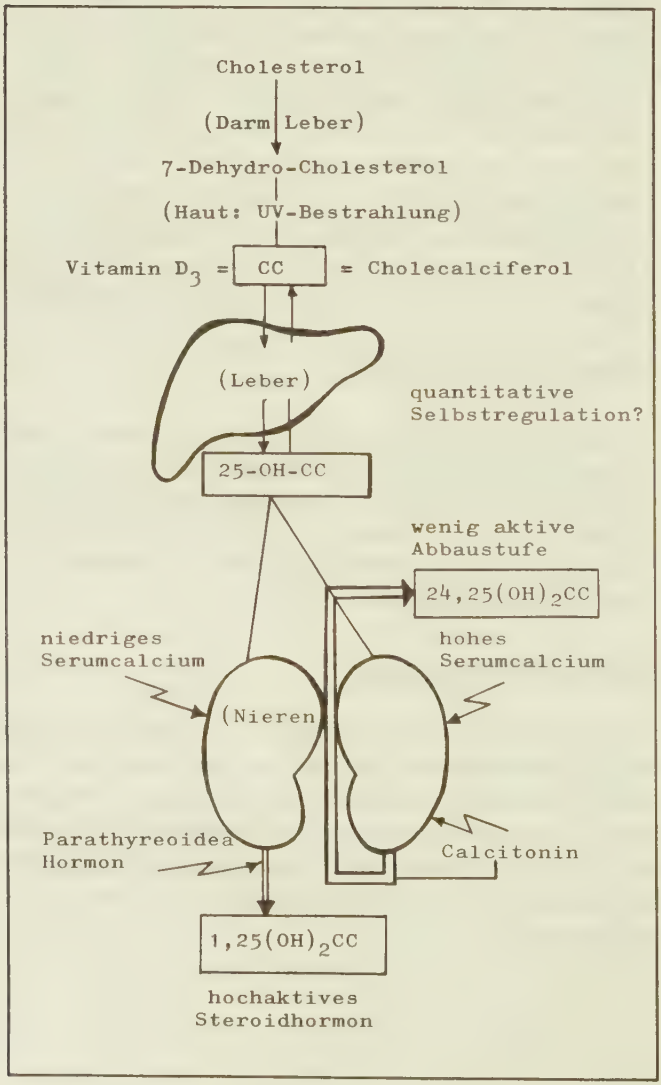
B.1.1. Vitamin-D-Stoffwechsel

Im Hinblick auf die Pathogenese der Rachitis spielt Vitamin D eine zentrale Rolle im Calcium-Stoffwechsel. Deshalb werden Stoffwechsel und Funktionen des Vitamin D in Anlehnung an die neuesten Forschungsergebnisse im Folgenden dargestellt (OMDAHL 1973, PIAZOLO 1973, SEIFERT 1975).

B.1.1.2. Historischer Überblick

1919 beschrieb HULDSCHINSKY die heilende Wirkung des ultravioletten Lichtes auf die Rachitis. Das dabei wirksame Prinzip wurde 1922 von MC COLLUM mit Vitamin D bezeichnet. Die chemische Struktur von Vitamin D wurde 1936 durch WINDAUS aufgeklärt. Daraufhin erfolgte die Laboratoriumssynthese von Vitamin D.

B.1.1.3. Aufbau- und Umbaustufen des Vitamin D_3 = Cholecalciferol und Darstellung der Regulationsmechanismen in Leber und Niere nach SWOBODA (1976).



B.1.1.4. Vitamin D - Bedarf

Bei ausreichender Sonnenbestrahlung ist der menschliche Körper nicht auf exogene Vitamin D - Zufuhr angewiesen. In der Haut wird bei Ultravioletttbestrahlung in einer photochemischen Reaktion aus Cholesterin 7-Dehydrocholesterin gebildet, das dann in Cholecalciferol = Vitamin D_3 umgewandelt wird. Eine Vitamin D_3 - oder Vitamin D_2 = Ergocalciferol-Substitution wird nur bei mangelnder Sonnenlichtexposition notwendig. Beim Erwachsenen wird der Tagesbedarf an Vitamin D auf 100 IE (0,0025 mg), beim Kind und Säugling auf 400 IE (0,01 mg) eingeschätzt. (SWOBODA 1976)

B.1.1.5. Vitamin D-Stoffwechsel und seine Regulation

Das in der Haut biosynthetisch erzeugte oder durch die Nahrung aufgenommene und intestinal resorbierte Vitamin D wird an Albumin und α_2 - Globulin gebunden, über das Blut zur Leber transportiert und dort in einer enzymatischen Reaktion am C_{25}-Atom zu 25-Hydroxycholecalciferol = 25-OH-D_3 hydroxyliert. Wahrscheinlich folgt die quantitative Regulation dieses Vorganges einem Gleichgewichtsprozeß nach dem Massenwirkungsgesetz, wobei das Produkt selbst in einem Rückkopplungsmechanismus regulierend wirken soll, d.h. je mehr 25-OH-D_3 vorhanden ist, um so weniger Vitamin D_3 wird zu 25-OH-D_3 umgewandelt. Das nicht hydroxylierte Vitamin D_3 kann in der Leber, in Muskulatur und Fettgewebe gespeichert werden.

Das 25-OH-D_3 gilt jedoch nicht als die im Calcium-Stoffwechsel wirksame Endsubstanz. Es soll vielmehr die entscheidende Transportform des Vitamin D darstellen, welche den größten Teil der im Blut nachweisbaren Vitamin D - Aktivität ausmacht. Über das Blut gelangt das 25-OH-D_3 in die Niere und wird dort am C_1 zu 1,25 - $(OH)_2$-D_3 hydroxyliert. Diese Verbin-

dung wurde 1971 von DE LUCA und Mitarbeitern isoliert und identifiziert. Auch dieser Metabolit des Vitamin D wird wahrscheinlich nur in der Menge erzeugt, wie er für die augenblickliche Situation des Calciumstoffwechsels notwendig ist. Die Umwandlung von 25-(OH)-D_3 zu 1,25-$(OH)_2$-D_3 ist z.B. maximal, wenn einem rachitischen, an Calcium verarmten Organismus Vitamin D_3 angeboten wird, und sie wird eingestellt, wenn der Serum-Calciumwert über der Norm liegt. Als regulative Faktoren sollen hier das Parathyreoideahormon (PTH) und Calcitonin einwirken (DE LUCA 1974, FRASER 1973).

Durch PTH wird die Synthese von 1,25-$(OH)_2$-D_3 gefördert. Der Blutspiegel von PTH ist bei Hypocalciämie ebenso wie die Konzentration von Phosphat im Blut und in den Zellen der Nierentubuli erhöht. Als typisches Beispiel für diese Art der Regulation wird die Konstellation bei der Vitamin D-Mangelrachitis angeführt (PRADER 1975).

Im umgekehrten Fall, z.B. bei einer Vitamin D-Intoxikation aber auch schon bei einem vermehrten Calciumangebot im Darm wird die Synthese von 1,25-$(OH)_2$-D_3 gehemmt und dafür der Umbau von 25-(OH)-D_3 in 24,25-$(OH)_2$-D_3, einem weitgehend inaktiven Metaboliten gefördert. Als hemmende Faktoren gelten dabei hohe Calcitonin - und Phosphatkonzentrationen im Serum.

Nachdem die Synthese von 1,25-$(OH)_2$-D_3 also hauptsächlich durch Hormone reguliert wird, muß das 1,25-$(OH)_2$-D_3, da es den Regulationspartner darstellt, somit gleichfalls als Hormon angesprochen werden. Es wird wie ein Hormon nur in einem einzigen Organ, der Niere produziert, in das Blut abgegeben, um auf diesem Wege zu den entfernteren Erfolgsorganen vor allem Darm und Knochen zu gelangen und dort intrazellulär wirksam zu werden. Damit gleicht 1,25-$(OH)_2$-D_3 vor allem den Stroidhormonen, mit denen es auch biochemisch verwandt ist (SWOBODA 1976).

B.1.1.6. Wirkungsweise von 1,25-$(OH)_2$-D_3

Das 1,25-$(OH)_2$-D_3 wird als aktives Endprodukt der metabolischen Umwandlung von Vitamin D angesehen. Die Wirksamkeit von 25-(OH)-D_3 gilt als 4 bis 5 mal und von 1,25-$(OH)_2$-D_3 bis zu 30-fach stärker als die Wirksamkeit von Vitamin D_3.

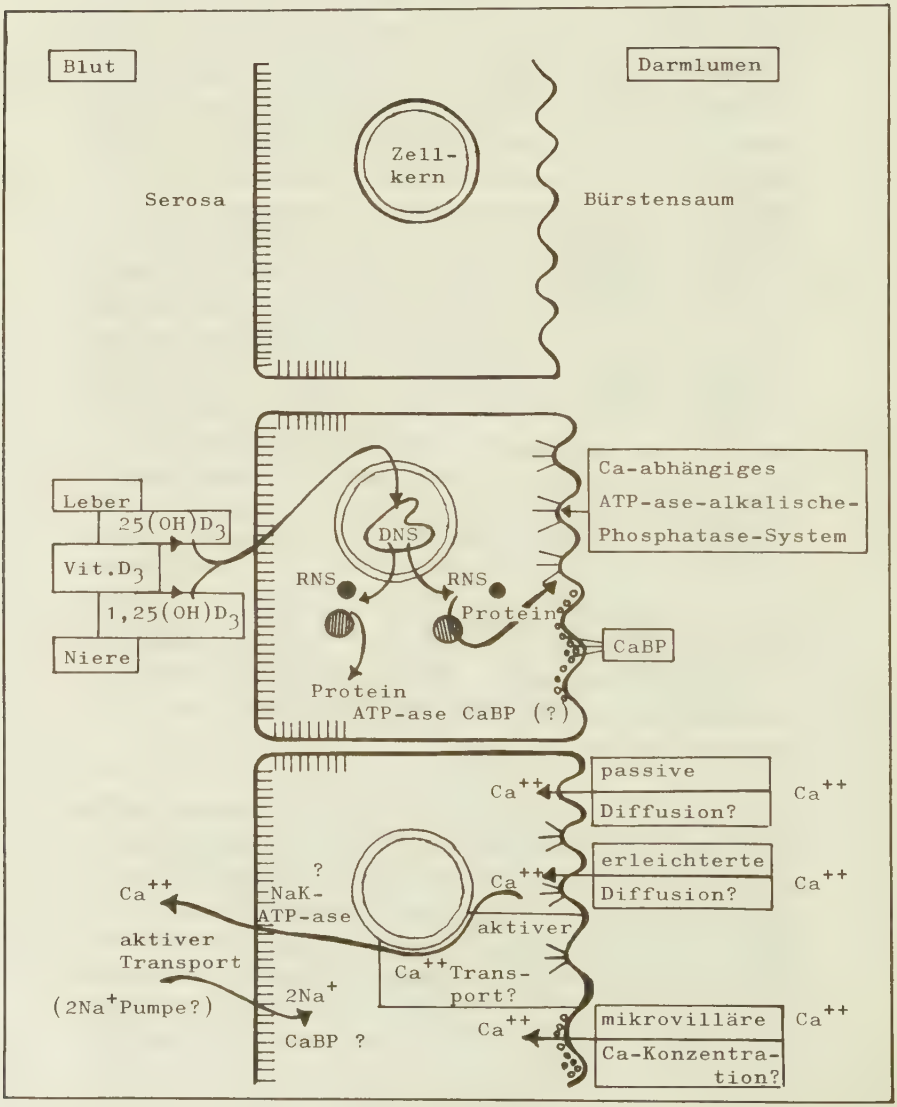
Die Wirkungsweise von 1,25-$(OH)_2$-D_3 wurde vor allem an den Zellen der Darmmucosa studiert. (WARNER 1975, SCHÄFER 1973) Auch hier ist der Vergleich zu den Steroidhormonen angebracht, da es wie diese an der DNS angreift. Um an die DNS-Matrizen zu gelangen, wird es an der Zelloberfläche der Darmmucosa an ein Cytocholrezeptorprotein gebunden, das offensichtlich eine außergewöhnliche Spezifität für 1,25-$(OH)_2$-D_3 besitzt, denn die zur Verfügung stehenden Mengen an 1,25-$(OH)_2$-D_3 sind sehr gering und liegen etwa bei 2×10^{-10} mMol. Intrazellulär soll das 1,25-$(OH)_2$-D_3 an einen Rezeptor im Zellkern gebunden werden (DE LUCA 1976) und dort eine Genaktivierung veranlassen, welche für die Synthese des Vitamin D-abhängigen, calciumbindenden Proteins = "CaBP" verantwortlich ist (WASSERMAN und TAYLOR 1966, 1974, WASSERMAN 1968).

Außerdem steigert 1,25-$(OH)_2$-D_3 wahrscheinlich die Aktivität einer Adenosintriphosphatase und einer alkalischen Phosphatase in den Mikrovilli der Darmmucosa (MELANCON und DE LUCA 1970, HOLDSWORTH 1970, MORIUCHI und DE LUCA 1976)

Diese durch 1,25-$(OH)_2$-D_3 aktivierten Proteine sollen also eine entscheidende Rolle im intestinalen Calciumtransport spielen. PIAZOLO (1973) hat das Zusammenwirken der genannten Faktoren in seinem Schema zur Calcium-Resorption an der intestinalen Schleimhautzelle (siehe S. 8 B.2.1.) sehr anschaulich dargestellt.

B.2. Modellvorstellungen zum intestinalen Calcium-Transport

B.2.1. Schema zur Calcium-Resorption an der intestinalen Schleimhautzelle nach PIAZOLO (1973)

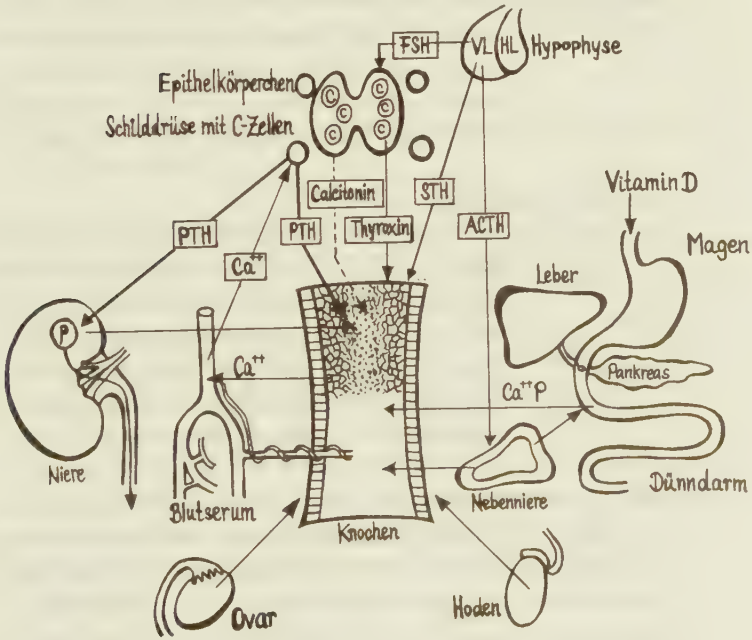


Regulative Einwirkungen verschiedener Organe und Organsysteme auf den Knochen.

FSH = Follikelstimmulierendes Hormon des Hypophysenvorderlappens (VL)

PTH = Parathormon

STH = Somatotropes Hormon des Hypophysenvorderlappens



Schema nach SANDRITTER (S. 689, Allgemeine Pathologie)

B.2.2. Mögliche Resorptionsmechanismen im Calciumtransport durch die Mucosazelle des Duodenums.

a. Einfache, passive Jonendiffusion

Definition: Die Diffusionsrate steht in einer linearen Abhängigkeit zur Größe eines elektrochemischen Gradienten. Voraussetzung ist die Durchgängigkeit der apikalen Zellmembran für die zu passierende Substanz.

b. Erleichterte Diffusion nach WILSON

Definition: Eine Substanz wird nicht gegen einen elektrischen Gradienten transportiert, sie tritt jedoch schneller durch die Membran hindurch als dies durch passive Diffusion erklärbar ist.

c. Aktiver Transport

Definition: Man versteht darunter einen Prozeß, der durch einen "Carrier" vermittelt wird, direkt an eine energieverbrauchende Reaktion in der transportierenden Zelle gekoppelt ist und den Netto-Transport einer Substanz gegen einen elektrochemischen Gradienten ermöglicht.

ad c. Der genaue Mechanismus eines aktiven Transportes für Calcium durch die intestinale Mucosazelle ist noch nicht geklärt. Jedoch gibt es wichtige indirekte Beweise für das Vorliegen eines "Aktiven-Carrier-vermittelten-Transportes": Erstens die Abhängigkeit der Durchtrittsrate einer Substanz von einer Energie verbrauchenden Reaktion, zweitens ihre Empfindlichkeit gegenüber Blockierung des Zellstoffwechsels und drittens ihre Begrenzung durch eine Sättigungskinetik.

Aus zahlreichen in vivo und in vitro Studien (WENSEL 1969, WALLING und ROTHMAN 1969, SCHACHTER 1960, EBEL 1969) läßt sich folgendes Ergebnis zusammenfassen:

Ein "Aktiver-Carrier vermittelter, energieverbrauchender Transport" dürfte entscheidend sein für die Resorption von Calcium durch die Mucosazelle im Duodenum. Dies ist bei den meisten Spezies auch der Ort der wirksamsten Calcium-Resorption. Dagegen scheinen in den distaleren Darmabschnitten der "Passive Transport" und die "Erleichterte Diffusion" nach Wilson oder auch eine Kombination von beiden die wichtigeren Mechanismen zur Calcium-Resorption zu sein.

B.2.3. Mögliche funktionelle Komponenten im "Aktiven Calcium-Transport"

Als mögliche funktionelle Komponenten in einem aktiven Calcium-Transport durch die Mucosazelle des Duodenums nennen OMDAHL und DE LUCA (1973) das durch Vitamin D stimulierbare Calcium bindende Protein = CaBP, das ebenso durch Vitamin D stimulierbare mikrovilläre Calcium abhängige ATP-ase-alkalische Phosphatase-System, ein $Na^{+}K^{+}$-ATP-ase-Pumpsystem an der basalen, lateralen Membran sowie Calcium-Granula in den Mitochondrien. Sie schreiben diesen Faktoren folgende unterschiedliche Aufgaben bei der Durchschleusung von Calcium durch die epitheliale Zelle zu:

a. Das Calcium abhängige ATP-ase-alkalische Phosphatase-System soll bei der initialen Aufnahme von Ca^{++} an der luminalen Seite der Mucosa wirken. Ob dieser initiale Resorptionsschritt als ein aktiver Transport oder als eine erleichterte Diffusion von statten geht, ist noch nicht geklärt.

b. Das CaBP soll nach DE LUCA (1971) für die transzelluläre Bewegung des Ca^{++}-Ions innerhalb der Schleimhautzelle von Bedeutung sein. WALLING und ROTHMAN (1969) dagegen nehmen an, daß CaBP nicht als "Carrier-Protein" sondern eher ähnlich einem Ionenaustauschharz als ein Sammler von Ca^{++}-Ionen in der mikrovillären Region wirkt. Für diese Theorie spricht auch die Lokalisation des CaBP, das sich vorwiegend im Bürstensaum, also an der luminalen Zellwandung befinden soll.

c. Da intrazelluläre Calciumkonzentrationen eine Höhe von 5 mMol während des Absorptionsprozesses erreichen können (WASSERMAN 1970), erscheint es notwendig, daß ein Großteil des Calciums intrazellulär gebunden werden muß, um deletäre Auswirkungen für die Zelle zu vermeiden. Daraus resultiert die Vorstellung, daß Calcium in Verbindung mit zellulären Elementen (z.B. Mitochondrien) als "Vehiculum" transportiert wird. SAMPSON und Mitarbeiter (1970) konnten elektronenmikroskopisch sogar spezielle Granula in den Mitochondrien von Vitamin D behandelten Ratten feststellen, welche bei rachitischen Tieren nur in der mikrovillären Region nachzuweisen waren.

d. Der letzte Schritt der Calcium-Translokation durch die epitheliale Zelle ist die Ausschleusung des Calciums in die Blutbahn. MARTIN und DE LUCA (1969) haben mit in vitro Versuchen den stimulatorischen Effekt von Natrium auf die Ausschleusung von Calcium an der Serosaseite der Darmzelle gezeigt. Sie stellten die Hypothese auf, daß eine Natrium-Kalium-abhängige ATP-ase als Calciumpumpe an der basal lateralen Membran der Mucosazelle wirkt und Calcium so gegen einen elektrochemischen Gradienten in die Blutbahn ausgeschleust werden kann.

B.2.4. Die Rolle des Calcium-ATP-ase-alkalische Phosphatase-Systems im intestinalen Calciumtransport

MARTIN und Mitarbeiter (1969) zeigten, daß Bürstensaumpräparationen vom Rattendünndarm eine Calcium abhängige ATP-ase besitzen, deren Aktivität durch Vitamin D gesteigert werden kann. Mit Versuchen am Bürstensaum des Kükendarmes konnten MELANCON und DE LUCA (1970) nachweisen, daß unter Vitamin D Gabe der Aktivitätsanstieg dieser Calcium abhängigen ATP-ase einem Anstieg in der intestinalen Calciumabsorption direkt parallel lief. Dies legte den Gedanken nahe, daß die initiale Aufnahme von Calcium durch die Mucosazelle einen energieliefernden Prozeß benötigt, der durch diese Calcium abhängige ATP-ase vermittelt wird. Spätere Studien von HAUSSLER (1970) ebenfalls am Kükendarm erbrachten eine entsprechende Reaktion der Aktivität alkalischer Phosphatasen. Der Anstieg der intestinalen alkalischen Phosphatase-Aktivität nach Vitamin D_3-Gabe lief gleichfalls eng parallel zur intestinalen Calciumabsorption. Außerdem konnten die beiden Enzymaktivitäten sowie die danach beobachtete Calciumabsorption durch Actinomycin D und Cycloheximide in vivo geblockt werden. Auf Grund dieser Untersuchungen und in Übereinstimmung mit weiteren Autoren (KRAWITT 1973, HOLDSWORTH 1970) sind nach OMDAHL (1973) diese beiden Enzymaktivitäten Calcium abhängige ATP-ase und intestinale alkalische Phosphatase dem gleichen Proteinkomplex zuzuordnen. Ob dieser Proteinkomplex als unspezifische Phosphatase oder als Calcium fordernde ATP-ase wirkt, ist jedoch noch nicht geklärt. Bis eine endgültige Definition vorliegt werden diese beiden Bürstensaum-Enzymaktivitäten von den oben genannten Autoren unter dem Begriff "Intestinales Calcium abhängiges ATP-ase-alkalische Phosphatase-System" zusammengefaßt.

B.3. Die "Antiepileptica-Rachitis"

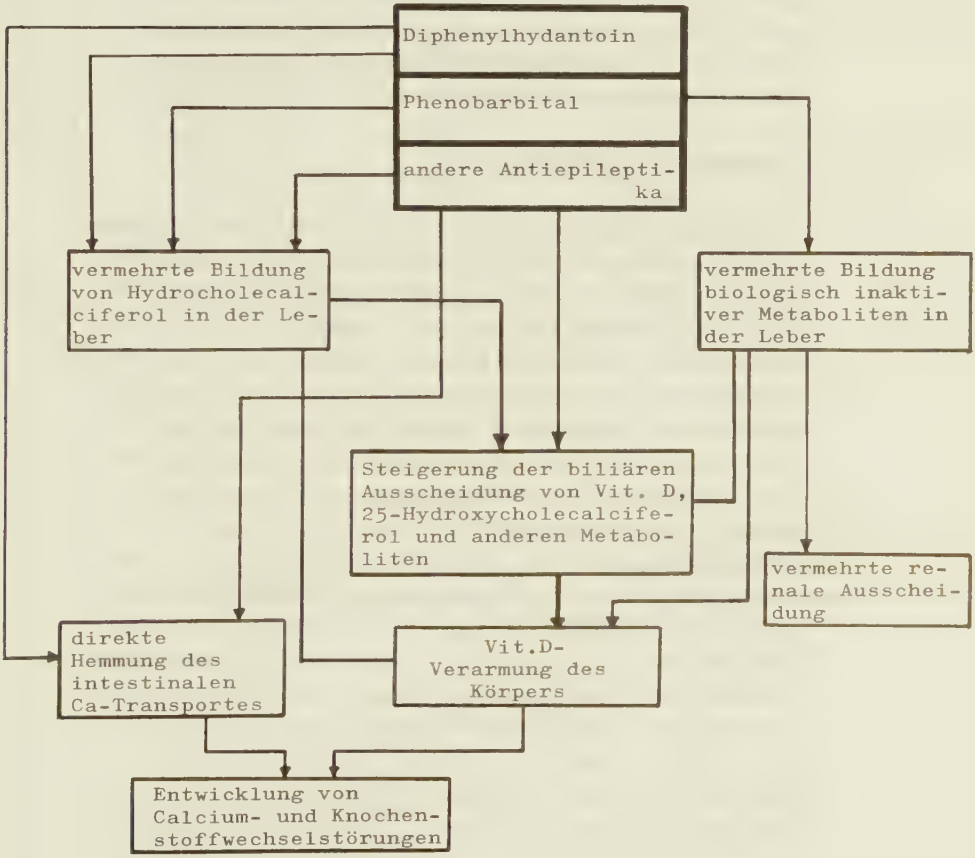
B.3.1. Historischer Überblick

Das Auftreten rachitischer Veränderungen unter antiepileptischer Langzeittherapie wurde in der europäischen Literatur erstmals 1967 von SCHMID und 1968 von KRUSE erwähnt. Sie stellten mit radiologischen Untersuchungsmethoden bei antiepileptisch behandelten Kindern und Jugendlichen Knochenveränderungen in wechselnder Ausprägung fest, vorwiegend eine Diploehyperplasie am Schädel, eine metaphysäre Osteodystrophie der langen Röhrenknochen und schließlich als schwerste Form eine diffuse Osteomalazie. 1970 fanden RICHENS und ROWE bei einer Untersuchung von 160 stationär behandelter Epileptiker in 22,5 % erniedrigte Serum-Calciumwerte und in 29 % erhöhte Werte der alkalischen Phosphatase im Blut. In der Folgezeit bestätigten DENT und Mitarbeiter (1970) sowie zahlreiche andere Autoren (MACLAREN 1973, LUCKERT 1975, LÜCKING 1973) das Auftreten von Knochenveränderungen und Störungen des Calciumstoffwechsels während einer Kombinationstherapie mit Phenobarbital und Diphenylhydantoin.

Nachdem bereits KRUSE die unter antiepileptischer Langzeitbehandlung auftretenden Knochenveränderungen erfolgreich mit hochdosierten Vitamin D-Applikationen behandelt hatte, und auch die neueren Untersuchungen auf eine Veränderung des Vitamin D-Stoffwechsels unter antiepileptischer Langzeittherapie hinwiesen, wurde der Begriff der "Antiepileptika-Rachitis" geprägt. Dabei muß betont werden, daß mit dem Begriff "antiepileptische Rachitis" die Knochenveränderungen bei Kindern umschrieben werden und die Veränderungen in Knochen - und Calciumstoffwechsel bei erwachsenen Epileptikern eher dem klinischen Bild der Osteomalazie entsprechen.

B.3.2. Hypothesen zur Pathogenese der Antiepileptika-Rachitis bzw. der Osteopathia antiepileptica.

3.2.1. Multifaktorielle Pathogenese
(Schema nach SCHAEFER 1973)



B.3.2.1. Multifaktorielle Pathogenese

Zu den einzelnen im obigen Schema aufgeführten pathogenetischen Faktoren für die "Osteopathia Antiepileptika" bestehen derzeit zahlreiche Untersuchungen und Erklärungsansätze. Damit werden zwar denkbare pathobiochemische Vorgänge sehr einleuchtend beschrieben, ob sie jedoch das gesamte pathogenetische Geschehen erfassen bleibt dahingestellt. Im Folgenden sollen die für unsere Untersuchung Richtung weisenden Hypothesen referiert werden:

B.3.2.2. Enzyminduktionstheorie

Vorwiegend für Phenobarbital aber auch für eine Kombinationstherapie mit Phenobarbital und Diphenylhydantoin (DPH) wurde die Enzyminduktionstheorie aufgestellt. Sie beruht auf der Vorstellung, daß diese antiepileptischen Medikamente in der Leber eine Fermentproduktion induzieren; vermutlich wird die Bildung einer Hydroxylase aktiviert. Über die genaue Wirkungsweise dieses hypothetisch vermehrt gebildeten Enzyms gibt es jedoch unterschiedliche Meinungen:
HAHN und Mitarbeiter (1970, 1971) beobachteten bei Patienten, die mit Phenobarbital behandelt wurden, erniedrigte Plasmaspiegel von 25-(OH)-D_3 und folgerten daraus einen durch die Enzyminduktion beschleunigten Abbau von Cholecalciferol(= Vitamin D_3) in biologisch inaktive Metaboliten, die polarer als 25-(OH)-D_3 seien. In weiteren Untersuchungen (1972) a) wiesen sie bei mit Phenobarbital behandelten Ratten eine erhöhte Aktivität von Tritium markiertem Cholecalciferol im glatten endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen und eine Verminderung in den Mitochondrien nach. Diese Beobachtung erklärten sie mit einem gesteigerten Umsatz von Vitamin D durch das endoplasmatische Retikulum. Es entstehe dadurch eine Substratverminderung für die eigent-

liche Hydroxylierung von Cholecalciferol in Position 25. In einer anderen Untersuchung (1972) b) stellten diese Autoren im Gegensatz zu den vorangegangenen Beobachtungen bei einer mit Phenobarbital behandelten Versuchsperson erhöhte Plasmaspiegel von radioaktiv markiertem 25-(OH)-CC fest. Dem entspricht die Untersuchung von SILVER und Mitarbeitern (1971), (1972) in der bei mit Phenobarbital behandelten Ratten und Schweinen ebenso erhöhte Plasmaspiegel von ^{3}25-(OH)-CC nach Gabe von radiomarkiertem ^{3}H-Vitamin D_3 gefunden wurden.
Auch SCHAEFER (1972) wies bei Patienten, die über Jahre mit verschiedenen Antiepileptika behandelt worden waren, eine erhöhte Plasmakonzentration von 25-(OH)-CC nach, wobei er keine Vermehrung biologisch inaktiver Metaboliten feststellte. Nach SCHAEFERS Ansicht (1973) bleibt es also unklar, ob wirklich eine Enzyminduktion mit einer vermehrten Hydroxylierung von 25-(OH)-CC stattfindet oder ob die sich zum Teil wiedersprechenden Untersuchungsergebnisse mit einer unterschiedlichen Vitamin D Ausgangslage bzw. einer Veränderung des Vitamin D-Pools zusammenhängen.
Für DPH widerlegte SCHAEFER letztere Hypothese, da in Tierexperimenten nach Behandlung mit DPH unter hohen Gaben von Vitamin D weder eine Erhöhung biologisch inaktiver Metaboliten noch sonstige wesentliche Veränderungen des Vitamin D-Stoffwechsels festgestellt werden konnten. Dies spricht für die im Folgenden dargestellte Hypothese zur Pathogenese der antiepileptischen Osteomalazie.

B.3.2.3. Das Intestinale Calcium-Transportsystem als indirekter Angriffspunkt für antiepileptische Medikamente

Vor allem die Hydantoine sollen nach Ansicht verschiedener Autoren ihre für die Pathogenese einer antiepileptischen Osteomalazie entscheidene Wirkung

am intestinalen Calcium-Transportsystem entfalten (KOCH 1972, CASPARY 1972, KRAFT 1973). SCHREIER (1976) zieht in Erwägung, daß eine direkte Beeinflussung der Sekretion von Parathormon durch die Gabe von Hydantoinen für die Störung der intestinalen Calcium-Aufnahme verantwortlich sein könnte. Eine andere Theorie besagt (JUBITZ 1977), daß Hydantoine durch Blockierung von spezifischen Rezeptoren eine verminderte Antwort der Endorgane Darm und Knochen auf 1,25-$(OH)_2$-D_3 bewirken.
Wir liefern mit unserer Untersuchung einen Beitrag zu der Hypothese, daß DPH reversibel den aktuellen Calcium-Transport beeinträchtigt, indem es hemmend auf Enzymsysteme wirkt, welche in den intestinalen Calcium-Absorptionsmechanismus involviert sind. Gestützt wird diese Hypothese durch verschiedene andere reversible Effekte, die durch DPH hervorgerufen werden: Reduktion der Folsäure - und Xyloseaufnahme, Hemmung der Folsäure-Dekonjugase und Hemmung intestinaler ATP-asen (GERSHON 1970, HEPNER 1970, REYNOLDS 1965, ROSENBERG 1968).

B.3.3. Das Antiepileptikum Phenhydan (DPH):

Therapeutisch wird Phenhydan eingesetzt bei grand mal Anfällen, bei verschiedenen Arten von generalisierten Anfällen und gegebenenfalls auch bei fokalen Anfällen (Jackson Anfälle, psychomotorische Anfälle, Halbseitenanfälle).

B.3.3.1. Chemisch, physikalische Eigenschaften

Die internationale Kurzbezeichnung für 5,5 Diphenylhydantoin (DPH) ist Phenhydan. Seine Summenformel lautet: $C_{15}H_{12}N_2O_2$, das Mol-Gewicht beträgt 252,3.

Die Strukturformel von DPH:

entspricht der Grundstruktur der meisten Antikonvulsiva, die durch einen 5 oder 6 teiligen Ring charakterisiert sind, wobei die Substituenten an dem Ring mit den klinischen Anfallstypen, welche durch diese Strukturverbindungen unter Kontrolle gehalten werden, korrelieren. Von seinen physikalischen Eigenschaften her gesehen ist DPH ein weißes, kristallines, geruchloses, geschmackloses Pulver, fast unlöslich in Wasser und wenig löslich in Alkohol und Äther. Es ist eine schwache Säure und wird auch als Natrium - und Calciumsalz therapeutisch angewandt. (DODSON 1976, DESITIN-WERK pharmazeutische Information)

B.3.3.2. Pharmakokinetik

B.3.3.2.1. Resorption

Die Resorption von oral verabreichtem DPH aus dem Magen-Darmtrakt wird durch die Säure-Dissoziationskonstante (= pKa) des DPH, durch seine Lipidlöslichkeit, durch den pH des Mediums, in dem sich DPH an der Resorptionsstelle verteilt, sowie durch die Löslichkeit und Konzentration von DPH in diesem Medium bestimmt. Die genannten Faktoren können durch die Anwesenheit bestimmter Speisen oder Medikamente im Darmtrakt und durch die Verabreichungsform der Wirksubstanz DPH zum Beispiel als Kapsel oder Tablette verändert werden. Die Resorption von DPH im Magen ist sehr gering, da

DPH beim pH des Magensaftes extrem unlöslich ist. Nach der Passage des DPH in das Duodenum, wo der pH annähernd 7 bis 7,5 ist, liegt eine größere Menge des Medikamentes in der ionisierten Form vor. Zusätzlich wird die Löslichkeit des DPH durch Gallensalze erhöht, wodurch im Duodenum insgesamt eine größere Resorptionsoberfläche entsteht. DILL (1956) konnte mit seinen Untersuchungen zeigen, daß im Duodenum die größte Resorption von DPH stattfindet. Der distale Teil des Duodenums ist auch der Ort der größten Reabsorption für DPH nach intravenöser Verabreichung (NOACH 1964). Insgesamt kann die Darmwand in allen Teilen des Darmtraktes in beiden Richtungen von DPH durchquert werden (NOACH 1964).
Die Löslichkeit von DPH im Blutplasma ist geringer als seine Löslichkeit in der intestinalen Flüssigkeit. Deshalb kann seine Resorption nur mit der Geschwindigkeit vonstatten gehen, mit der es an Plasma - und Gewebekomponenten gebunden wird, mit der es vom Blutstrom in die Fettspeicher aufgenommen wird, mit der es in der Leber metabolisiert und in den Urin oder die Gallenflüssigkeit ausgeschieden wird. Die Resorptionsrate wird also hauptsächlich von der Geschwindigkeit bestimmt, mit der DPH in den Blutstrom eintreten kann, wohingegen die Passage über die Zellwand keinen geschwindigkeitsbegrenzenden Faktor darstellt, da der größte Teil des DPH hier in der nicht-ionisierten Form vorliegt und damit relativ lipidlöslich ist.

B.3.3.2.2. Plasmaeiweißbindung

DPH wird nach seinem Eintritt in die Blutzirkulation schnell und reversibel an Proteine gebunden. Beim Menschen beträgt die Plasmaeiweißbindung nach LUNDE (1970) 69 bis 96 % bei 37°C und kann durch verschiedene Einflüsse wie zum Beispiel

Medikamentenkonzentration, Albuminkonzentration oder Alter des Patienten beeinflußt werden.

B.3.3.2.3. Verteilung

Nach seiner Resorption kann sich der nicht proteingebundene Anteil des DPH frei im Körper verteilen, da DPH beim pH des Plasmas vorwiegend in der nicht-ionisierten Form existiert und diese eine schnelle Bewegung über die Zellmembranen erlaubt. In bestimmten Geweben wie Leber, Gehirn und Muskulatur kann eine Akkumulation von DPH stattfinden, die wahrscheinlich mit seiner Bindungsfähigkeit an Nukleoproteine im endoplasmatischen Retikulum zusammenhängt (WOODBURY).

B.3.3.2.4. Halbwertzeit

ARNOLD und GERBER (1970) beschreiben individuell verschiedene, dosisabhängige Halbwertzeiten bei einer Langzeittherapie mit DPH, die zwischen 7 und 42 Stunden schwanken. Sie erklären diese Beobachtung mit dem Bestehen einer geschwindigkeitsbestimmenden Enzymreaktion im Metabolismus des DPH, deren Sättigung bei individuell verschieden hohen DPH-Dosen erreicht, beziehungsweise überschritten wird. Medikamente, die mit dem Metabolismus von DPH interferieren, können seine Halbwertzeit ebenfalls verändern (CUCINELL 1963, HANSEN 1968, 1966, KUTT 1966, WINDORFER 1977). Weiterhin können genetische Faktoren wie zum Beispiel die Unfähigkeit der Leber zur p-Hydroxylation von DPH die Halbwertzeit und damit auch den Blutspiegel von DPH erhöhen (KUTT 1964)

B.3.3.2.5. Ausscheidung

DPH muß, um adäquat ausgeschieden werden zu können, in der ionisierten Form vorliegen. Es wird in der

Leber unter Mitwirkung einer enzymatischen Reaktion zum Teil zu 5-p-Hydroxyphenyl-5-phenylhydantoin (HPPH), zum Teil in andere Metaboliten umgewandelt. Diese Stoffwechselprodukte gelangen über die Gallenflüssigkeit in die intestinale Flüssigkeit. Nur ein geringer Anteil wird direkt über die Faeces eliminiert. Der Hauptanteil wird vom Darm wieder ins Blut reabsorbiert und gelangt zur Niere. Die Ausscheidung in der Niere erfolgt wahrscheinlich durch glomeruläre Filtration und aktive tubuläre Sekretion, wobei letzterer Prozeß der entscheidende sein dürfte (WOODBURY).

B.3.3.3. Wirkungsmechanismus von DPH

Die primäre Wirkungsseite und der genaue Wirkungsmechanismus von DPH sind bis heute noch ungeklärt.
FERENDELLI (1977) stellt auf Grund seiner Untersuchungen an isolierten präsynaptischen Membranen (Synaptosomen) aus Rattengehirnen folgende zwei Wirkungsmechanismen als Erklärung für die antiepileptische Wirkung von DPH zur Diskussion: DPH hemmt sowohl den Natrium - wie auch den Calciumeinstrom in die Zelle während der zellulären Depolarisation und es verändert den Spiegel der cyclischen Nucleotide im Gehirn.
Bei DEUPREE (1977) werden verschiedene Meinungen und Untersuchungsergebnisse zahlreicher Autoren (FESTOFF 1968, GILBERT 1976, WILENSKY 1972, DEUPREE 1976) bezüglich einer Hemmung oder Stimulation einer Natrium-Kalium abhängigen ATP-ase durch DPH diskutiert. Die zwei Hypothesen DEUPREE's zum Wirkungsmechanismus von DPH sind: Eine Förderung des aktiven Transportes von Natrium aus der Zelle oder eine mögliche Hemmung der Natriumaufnahme durch DPH, indem es aktivierte Kanäle, durch die Natriumionen normalerweise in das Axon treten, blockiert.

B.3.3.4. Nebenwirkungen von DPH genereller Art

Die Nebenwirkungen von DPH lassen sich in dosisabhängige und weitgehend dosisunabhängige einteilen (BOHLEN 1975). Die dosisabhängigen Nebenwirkungen treten häufig in der Einstellphase auf. Frühsymptome sind: Nystagmus, Tremor, Diplopie, Magenbeschwerden, Schwindel, zerebellare Ataxie. Sie können meist durch eine Dosisreduzierung behoben werden.
Als weitgehend dosisunabhängige Nebenwirkungen werden allergische Exantheme, Zahnfleischhypertrophie, Beeinträchtigung der Funktion von Knochenmark und Leber, Fieber, Drüsenschwellung und Osteopathien beobachtet. Nach BOHLEN und HERTL (1975) ist die Unterscheidung zwischen dosisabhängigen und dosisunabhängigen, allergisch-toxischen Symptomen jedoch oft schwierig, da Überdosierungen in Toxizität mit Dauerfolgen übergehen können.
Unterschiedliche Meinungen zur Dosisabhängigkeit bestehen auch bei der Antiepileptica-Osteomalazie. Den Autoren KOCH (1972) und KRAFT (1973) zufolge scheint die Intensität und Dauer der DPH-Gabe für die Entwicklung einer Antiepileptica-Osteomalazie nur von geringer Bedeutung zu sein. Ebenso verneint LIVINGSTON (1974) auf Grund radiologischer und biochemischer Untersuchungen, daß eine anticonvulsive Langzeitmedikation ursächlich für die Entwicklung einer Rachitis ist. Dagegen betonen HAHN (1976), DODSON (1976) und WINDORFER (1977) generell eine dosisabhängige Erhöhungsquote der Nebenwirkungen von DPH vor allem bei einer kombinierten Antikonvulsiva-Therapie auf Grund der Medikamenteninteraktion und der individuell verschiedene Reaktion der Patienten auf die antiepileptische Behandlung. NOLTE (1975) und RIETBROCK (1975) empfehlen die Kontrolle des Plasmaspiegels von DPH. Sie könnte außer den üblichen frühdiagnostischen

Maßnahmen (LIVINGSTON 1972, 1973) zusätzlich zur Prophylaxe einer Antiepileptica-Osteomalazie herangezogen werden, zumal eine Dosisunabhängigkeit von DPH bislang für die Pathogenese der Antiepileptica-Osteomalazie noch nicht bewiesen ist.

Spezielle Nebenwirkung von DPH

B.3.3.5. Störung des intestinalen Calciumtransportes durch DPH

Es ist bis heute noch ungeklärt an welchem Punkt des überaus komplexen Regelkreises zur Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase DPH störend wirkt. Eine naheliegende Erklärung ist die direkte Hemmung der intestinalen Calciumabsorption durch DPH. Inwieweit damit auch eine Störung des Vitamin D-Stoffwechsels durch DPH von Bedeutung ist, steht noch zur Diskussion.
CORRADINO (1976) stellt an Hand seiner 48-Stunden-Versuche am embryonalen Kükendarm die Hypothese auf, daß DPH einen direkten Hemmeffekt auf den Vitamin D vermittelten intestinalen Calciumabsorptionsmechanismus habe. Er beobachtete in diesen Versuchen abfallende CaBP- und cAMP-Konzentrationen sowie eine verminderte Aufnahme von radioaktiv markiertem ^{45}Calcium durch das Gewebe in einer DPH-Dosis unabhängigen Form. Dabei war dieser Effekt offensichtlich nicht mit einer generalisierten Vergiftung verbunden, da sich das DPH-behandelte Gewebe nicht vom Kontrollgewebe unterschied. Im Gegensatz zu CORRADINO zeigte KOCH (1972) ebenfalls in Versuchen an Ratten, daß durch Natrium-Phenytoin bereits in Dosen, die den Vitamin D-Metabolismus noch nicht signifikant veränderten, die intestinale Calciumabsorption gehemmt wurde. HAHN (1976) leitet daraus einen direkt hemmenden Effekt des Natrium-Phenytoins auf ein

membrangebundenes ATP-ase-Transportsystem ab, das den Ionentransport über die Zelle vermittelt.

Unsere ebenfalls hypothetische Vorstellung über den Mechanismus der Störung des intestinalen Calciumtransportes durch DPH entspricht der bei DUEPREE (1977) geäußerten These: DPH könne nicht nur an neuronalem Gewebe sondern auch an intestinalem Gewebe über die Hemmung energieliefernder Enzymsysteme (ATP-ase, alkalische Phosphatase) die Aktivierung von Kanälen blockieren, über die Calcium-Ionen durch die Mucosazelle transportiert werden.

C. Experimenteller Teil

Untersuchung über die direkte Wirkung von DPH auf Enzymsysteme der duodenalen Calciumresorption an Ratten.

C.1. Tierzucht

C.1.1. Anzahl und Alter der Versuchstiere, DPH-Verabreichung, Tierhaltung.

Wir untersuchten ein Kollektiv von insgesamt 58 männlichen und weiblichen WHISTAR-Ratten. Das Körpergewicht der Tiere lag zwischen 90 g und 440 g, wobei das mittlere Gewicht bei 246 $\pm$ 70 g lag. 52 Ratten hatten ein mittleres Alter von 5 bis 8 Monaten, 6 Ratten waren Jungtiere (6 bis 8 Wochen).
Versuchskollektiv: 31 Ratten wurden mit 20 mg DPH/Tag behandelt. Die minimale Behandlungsdauer lag bei 33 Tagen, die maximale bei 53 Tagen (für 25 Tiere). Die restlichen 6 Tiere waren Jungtiere und wurden nur 10 bis 16 Tage lang mit DPH behandelt. Zur Verabreichung des DPH wurden 3 1/4 Tabletten Phenhydan^{R} (1 Tablette = 100 mg Diphenylhydantoin) vom Desitin Werk Carl Klinke GmbH Hamburg in 16 ml 5 %-igem Äthanol-Leitungswasser unter ständigem Rühren gelöst und die DPH-Suspension von 325 mg DPH/16 ml in den zu verabreichenden Portionen von in etwa 20 mg DPH/1 ml in Eppendorfgefäße abgefüllt. Die DPH-Suspension wurde zur Vermeidung einer Sedimentation täglich neu, kurz vor der Verfütterung aufbereitet. Zur Verabreichung des Medikamentes, jeweils einmal täglich um die Mittagszeit, wurden die Tiere in einem verschließbaren Glasgefäß mit einigen Tropfen Äther kurz sediert und ihnen dann mit einer gebogenen Metallsonde die DPH-Suspension eingeflößt.
Kontrollkollektiv: 27 Ratten wurden in der gleichen Weise, jedoch nur mit dem Lösungsmittel behandelt.

Die Tiere schluckten selbständig und waren nach der Sondierung wieder sofort aktiv bewegungsfähig.
Der Tierstall war belichtet. Die Ratten wurden zu mehreren in den üblichen Rattenkäfigen gehalten. Sie bekamen eine normierte Altromin-Haltungsdiät.

Getestet wurden die Tiere paarweise, jeweils ein Kontrolltier und ein mit DPH gefüttertes Tier (bis auf 4 mit DPH behandelte Tiere, die in einem Dreierversuch getestet wurden, 2 DPH-Tiere und 1 Kontrolltier) in genau parallel ablaufender Versuchsanordnung, um durch tagesbedingte, minimale Veränderungen im Versuchsablauf, mögliche Fehler zu vermeiden. Demgemäß erfolgte die statistische Auswertung der Versuche ebenfalls paarweise (siehe Kapitel Statistik).

C.1.2. Verhaltensbeobachtungen an den DPH behandelten Ratten

Die mit DPH behandelten Ratten bewegten sich deutlich weniger lebhaft in ihren Käfigen als die Kontrollratten und kauerten sich häufig in kleinen Gruppen zusammen.
Bei der Äthersedierung wurden die Abwehrreaktionen in deutlich kürzerer Zeit gedämpft als bei den Kontrolltieren. Im Laufe der Behandlung wurden die DPH-Tiere insgesamt zutraulicher und wehrten sich auch ohne Äther nicht mehr gegen das Sondieren.

An äußeren Veränderungen war bei allen DPH-Tieren festzustellen, daß ihr anfangs weißes, glattes Fell gelblich, stumpf und struppig wurde. Vereinzelt trat auch eine katzenbucklige Haltung auf, und bei einigen Tieren wurde der Gang schleppend und etwas unbeholfen.
Bei der Präparation des Darmes fiel gelegentlich eine gelbliche Färbung der Mucosa bei den DPH-Tieren auf.

C.2. Versuchsaufbau

2.1. Methode zur Gewinnung der gereinigten Bürstensaumfraktion des Rattenduodenums

Zur Präparation des Bürstensaumes wurde die bei FORSTNER (1967) beschriebene Technik angewandt. Sie besteht im Wesentlichen darin, vom intakten Bürstensaum nach der Elimination subzellulärer Bestandteile die mikrovilläre Membranfraktion, welche den Großteil der zu untersuchenden Enzyme (u.a. auch ATP-asen und alkalische Phosphatase) enthält, von dem fibrillären Rückstand zu trennen.

Im Einzelnen gingen wir folgendermaßen vor:

Mucosaernte:
Die Ratten wurden am Morgen des Versuchstages durch Dekapitation getötet. Der in toto entnommene Dünndarm wurde sofort in eisgekühlte 0,9 %-ige NaCl-Lösung gelegt, anschließend im Kühlraum vom proximalen zum distalen Ende hin mit 0,9 %-iger auf 3° Celsius (plus) gekühlter NaCl-Lösung durchgespült, um ihn von Nahrungsresten zu reinigen, und abschließend nochmals mit 5 mM EDTA-Lösung gewaschen. Zur weiteren Präparation wurde nur das obere (proximale) Drittel des Gesamtdünndarmes verwendet, da wir hauptsächlich den duodenalen Dünndarmanteil gegebenenfalls mit oberem Jejunum untersuchen wollten. Dieses teilten wir nun in drei gleiche Teile, schlitzten sie der Länge nach mit einem scharfen Skalpell auf und fixierten sie mit der Mucosaseite nach oben auf einer Paraffinplatte. Mit einem gereinigten Objektträger wurde nun von jedem Drittel die Mucosa vorsichtig abgeschabt und getrennt in vorher an einer Feinwaage (NETTELER) gewogenen, auf Eis gelegte Mikroeppendorfgefäße abgefüllt. Die gefüllten Gefäße wurden wiederum gewogen und so das genaue Gewicht der jeweiligen "Mucosaernte" bestimmt.

Suspension der Mucosaernte, Homogenisierung, Zentrifugation und Waschung zur Gewinnung der "Roh-Bürstensaumfraktion"

Im nächsten Schritt stellten wir eine etwa 2 %-ige Mucosasuspension in 5 mM EDTA-Lösung pH 7,4 her, die dann über einen Zeitraum von 25 sec. durch Homogenisation am Ultraturrax unter Eiskühlung aufgeschlossen wurde. Daraufhin erfolgte die Waschung des Homogenates durch dreimalige Zentrifugation bei einer Beschleunigung von 450 g in der Christ-Kühl-Zentrifuge über jeweils 12 min., wobei das "Pellet" jeweils wiederum mit EDTA-Puffer entsprechend dem Ausgangsvolumen resuspendiert wurde. Damit erhielten wir die gewaschene "Roh-Bürstensaumfraktion".

Sedimentation, Filtration, Zentrifugation mit Waschung zur Gewinnung der "Gereinigten Bürstensaumfraktion"

Die "Roh-Bürstensaumfraktion" wurde nun mit 5 bis 10 ml einer eisgekühlten Lösung von 0,8 mM EDTA und 90 mM NaCl gründlich gemischt und 30 min. lang bei einer Temperatur von 0^{o} Celsius stehen gelassen. In dieser Zeit trennte sich ein getrübter Überstand von einem Sediment. Zur Entfernung der DNS- und RNS-Assoziate in diesem getrübten Überstand wurden Überstand und Sediment auf einen kleinen Büchner-Trichter aufgegeben, der mit einer definierten Lage an Glaswolle (Pyrex Brand Nr. 3950) gefüllt war. Mittels einer Wasserstrahlpumpe wurde nun gefiltert und mit 5 bis 10 ml eisgekühlter 5 mM EDTA nachgespült. Das Filtrat wurde anschliessend wiederum dreimal bei 450 g über 10 min. zentrifugiert und das "Pellet" jeweils in 2 bis 3 ml 0,1 M Tris HCl pH 7,4 resuspendiert. Als Ergebnis dieses Schrittes erhielten wir die "Gereinigte Bürstensaumfraktion" in 2 bis 3 ml 0,1 M Tris HCl, pH

7,4. Abschließend wurde diese Fraktion in einem Potter-Glashomogenisator unter Eiskühlung homogenisiert und bis zu den Enzymtests und zur Proteinbestimmung auf Eis gestellt.

C.2.2. Enzymatische Bestimmungen

2.2.1. Bestimmung der Mg, Ca abhängigen ATP-ase-Aktivität in der "Gereinigten Bürstensaumfraktion"

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms ATP-ase im "Gereinigten Bürstensaum" erfolgte in Anlehnung an die bei MARTIN, MELANCON und DE LUCA (1969) beschriebene Methode.
Die Aktivitätsbestimmung der ATP-asen in der gereinigten duodenalen Bürstensaumfraktion erfolgte für die DPH behandelte Ratte und die Kontrollratte jeweils dreifach, um mögliche Pipettierfehler auszuschließen und resultierte im Mittelwert. Sie wurde folgendermaßen durchgeführt:

Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml und setzte sich zusammen aus:

1.	0,6 ml	0,1 M	Tris HCl-Puffer pH 7,4
2a.	0,1 ml	0,05 M	$MgCl_2$ + 0,1 M $CaCl_2$
oder			
2b.	0,1 ml	0,05 M	$MgCl_2$
3.	0,1 ml	0,1 M	ATP-Na_2-Salz (Fa. Boehringer Mannheim) in Tris HCl-Puffer pH 7,4
4.	0,2 ml		gereinigte Bürstensaumfraktion

ad 1. für den Ouabain-Hemmversuch wurden

0,6 ml 3,34 mM Ouabain in 0,1 M Tris HCl-Puffer pH 7,4

verwendet.

Die Reagentien 1,2,3 wurden in mit Parafilm verschließbare, mit Phosphat freiem Spülmittel gesäuberte Zentrifugengläser pipettiert. Nach Erreichen der Inkubationstemperatur von 37° Celsius über 5 min. im Wasserbad wurde die Enzymreaktion durch Zupipettierung von 0,2 ml gereinigter Bürstensaumfraktion gestartet. Anschließend wurden diese Proben unter gutem Mischen 15 min. im Wasserbad bei 37° Celsius gelassen. Nach dieser exakt mit der Stoppuhr gemessenen Reaktionszeit von 15 min. wurde die Enzymreaktion durch Eiskühlung und Verdünnung mit den Phosphatreagentien gestoppt.

Die Phosphatbestimmung führten wir nach EIBL und LANDS (1969, 1970) durch. Wir verwendeten dazu Phosphatreagentien und Phosphatstandardlösung (SERVA Feinbiochemica GmbH u. Co Heidelberg).

Je 0,2 ml des Reaktionsvolumens wurden mit 4,8 ml H_2O verdünnt, dann wurden 0,5 ml tritonhaltiges Phosphatreagens I zupipettiert und nach gutem Mischen Phosphatreagens II, bestehend aus Ammoniumheptamolybdat in 6 N H_2SO_4-Lösung, zugegeben. Es wurde wiederum gut gemischt und nach genau 20 min. der Extinktionswert für jede einzelne Probe in 1 ml Mikroküvetten bei 660 nm an einem Zeiss-Spektralphotometer gegen einen Leerwert abgelesen. Der Leerwert enthielt die gleichen Reagentien wie die Proben mit Ausnahme der 0,2 ml gereinigter Bürstensaumfraktion, die durch 0,2 ml destilliertes Wasser ersetzt wurden.
Die für jede Probe gemessenen Extinktionswerte wurden zu einer Eichkurve in Beziehung gesetzt. Diese Eichkurve war mit den gleichen Reagentien in einem Vorversuch mit steigenden Konzentrationen eines Phosphatstandards (K_2HPO_4) erstellt worden. So konnte die in jeder Probe bei der Enzymreaktion umgesetzte Phosphatmenge mittels des jeweilig gemessenen Extinktionswertes direkt an dieser Eichkurve

abgelesen werden. Der angewandte Phosphattest erforderte einen Phosphatgehalt der Proben zwischen 10 und 100 nMol, um mit den Extinktionswerten in den linearen Anteil der Eichkurve zu kommen. Wenn unsere Extinktionswerte höher lagen, mußten wir die Proteinausgangslösung mit Puffer verdünnen, um in den optimalen Bereich der Eichkurve zu kommen. Um nun die "spezifische Aktivität" der Mg, Ca abhängigen ATP-ase zu berechnen, mußten wir noch die Proteinmenge der Bürstensaumlösungen bestimmen (siehe C.2.2.3. Proteinbestimmung nach LOWRY).

Definition der Spezifischen Aktivität:

Die spezifische Enzymaktivität der ATP-ase ist gleich der Anzahl nMol Phosphat, die in einer Minute von 1 mg Protein aus dem Substrat ATP befreit wird.

(mU / mg / min)

C.2.2.2. Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase

Die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase in der gereinigten Bürstensaumfraktion wurde unter Verwendung von p-Nitrophenylphosphat als Substrat bestimmt.
Das Produkt der Enzymspaltung

p-Nitrophenylphosphat ⟶ p-Nitrophenol

kann im alkalischen Milieu bei 405 nm photometrisch erfaßt werden, während das Substrat selbst bei dieser Wellenlänge nicht absorbiert. Somit kann

die Farbintensität als Maß für die Enzymaktivität verwendet werden.

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms alkalische Phosphatase wurde nach NORMAN (1970) und EICHHOLZ (1967) folgendermaßen durchgeführt:

Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml und setzte sich zusammen aus:

1.	0,5 ml	0,4 M	Glycinpuffer pH 9,4	
2.	0,1 ml	40 mM	$MgCl_2$	
3.	0,05 ml	10 mM	$COSO_4$	
4.	0,05 ml	20 mM	Zn-Acetat	in H_2O
5.	0,1 ml	100 mM	p-Nitrophenylphosphat	
6.	0,2 ml		gereinigte Bürstensaumfraktion	

ad 1. für den Ouabain-Hemmversuch wurden

0,5 ml 20 mM Ouabain gelöst in 0,4 M Glycinpuffer pH 9,4

verwendet.

Die Reagentien 1,2,3,4 wurden in Zentrifugengläser pipettiert, sodann wurde 0,2 ml gereinigte Bürstensaumfraktion zugegeben und die Reaktionslösung für eine Incubationszeit von 5 min. bei 37° Celsius stehen gelassen. Durch Zupipettierung von 0,1 ml 100 mM p-Nitrophenylphosphat wurde die Enzymreaktion gestartet (= Substratstart). Die nun einsetzende Farbveränderung wurde an einem auf 25° Celsius thermostatisierten EPPENDORF-Photometer mit Schreiber bei einer Wellenlänge von 405 nm in ΔE/min. gemessen. Nachdem der Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 405 nm 18,5 $\mu Mol^{-1} x cm^2$ beträgt, wurde zunächst die

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\text{E/min. x 1,0 ml (Reaktionsvolumen)}}{\text{18,5 x 1,0 ml (Bürstensaumvolumen)}}$$

$$= \text{mU / ml Bürstensaumlösung}$$

berechnet.

Die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase, definiert als die Anzahl der Mol Substrat, die in einer Minute von 1 mg Protein hydrolysiert werden, konnte dann nach der Formel:

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{\text{Volumenaktivität (mU/ml)}}{\text{Proteinkonzentration der Bürstensaumlösung (mg/ml)}}$$

$$= \frac{\text{mU}}{\text{mg}}$$

berechnet werden.

C.2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration in der gereinigten Bürstensaumfraktion

Den Proteingehalt in der gereinigten Bürstensaumfraktion bestimmten wir nach LOWRY et al. (1951).

Als Reagentien wurden dafür folgende Lösungen verwendet:

1. 3 %-ige Na_2CO_3-Lösung in 0,1 N NaOH
2. 2 %-ige $CuSO_4$ x SH_2O-Lösung
3. 4 %-ige Na-Tartrat-Lösung
4. Folinreagens 1:2 verdünnt
5. 0,05 ml gereinigte Bürstensaumfraktion in 0,45 ml H_2O

Zu der Bürstensaumfraktion wurden 5 ml einer Mischung der Lösungen 1,2 und 3 im Verhältnis 50:1:1 zupipettiert. Diese Mischung wurde geschüttelt und nach genau 10 Minuten 0,5 ml Folinreagens zugegeben. Es wurde wiederum geschüttelt und nach genau 30 Minuten die optische Dichte bei 660 nm am Zeiss-Spektralphotometer abgelesen.
Die für jede Probe erhaltenen Exstinktionswerte wurden zu einer Eichkurve in Beziehung gesetzt. Diese war in einem Vorversuch unter den gleichen Reaktionsbedingungen mit steigenden Konzentrationen eines Serum-Albuminstandards in H_2O-Lösung erstellt worden. An Hand dieser Eichkurve konnten somit die Proteinkonzentrationen für jede Probe direkt abgelesen werden.
Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde dreifach bestimmt, ein Mittelwert gebildet, um damit mögliche Pipettierfehler auszuschließen.

D. Ergebnisse und Auswertung

D.1. Angewandte statistische Verfahren

Die statistische Auswertung der untersuchten Parameter wurde an der EDV-Anlage Typ TR 440 des Rechenzentrums der Universität Würzburg vorgenommen. Von allen Meßgrößen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung und dem mittleren Fehler des Mittelwertes (MFM-Bereich) bestimmt. Alle Variablen wurden auf ihre Normalverteilung geprüft. Da eine Normalverteilung generell nicht vorlag, wurden verteilungsunabhängige Signifikanzprüfungen vorgenommen:
Rangkorrelation, U-Test nach MANN und WITNEY und der WILCOXON-Test für gepaarte Stichproben.
Alle Tests wurden auf dem 95 %-Niveau ausgewertet.

Literatur: VON DER WAERDEN (1957), WEBER (1967), PFLANZAGL (1968), MATHER (1947)

D.2. Untersuchte Parameter

Mit den folgenden 12 Parametern haben wir die statistische Auswertung unserer Versuche vorgenommen:

1. Nummer der Versuchsreihe
2. Körpergewicht des untersuchten Tieres in Gramm
3. Gewicht der aus dem ersten Dünndarmdrittel (Duodenum und oberes Jejunum) gewonnenen Mucosa in Gramm
4. Proteinkonzentration der jeweiligen Mucosaernte in mg / ml
5. Spezifische Enzymaktivität der ATP-ase in $MgCl_2$-Lösung in mU/mg Protein/min.
6. Spezifische Enzymaktivität der ATP-ase in $MgCl_2$-Lösung unter Zusatz von Ouabain = g-Strophantin (als spezifischer Inhibitor von Na, K-ATP-asen) in mU/mg Protein/min.
7. Spezifische Enzymaktivität der ATP-ase in $MgCl_2$+

$CaCl_2$-Lösung in mU/mg Protein/min.

8. Spezifische Enzymaktivität der ATP-ase in $MgCl_2$+ $CaCl_2$-Lösung unter Zusatz von Ouabain (als spezifischer Inhibitor von Na, K-ATP-asen) in mU/mg Protein/min.
9. Spezifische Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase in mU/mg Protein/min.
10. Spezifische Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase unter Zusatz von Ouabain in mU/mg Protein/min.
11. DPH-Fütterungszeit
12. Differenz zwischen der spezifischen Enzymaktivitäten der ATP-asen in $MgCl_2$+$CaCl_2$-Lösung und der spezifischen Enzymaktivitäten der ATP-asen in $CaCl_2$-Lösung in mU/mg Protein/min.

D.3. Statistische Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse (Einzelwerte siehe Anhang)

D.3.1. Mittelwerte der gemessenen spezifischen Enzymaktivitäten in mU/mg Protein/min. mit Streuung und mittlerem Fehler des Mittelwertes (MFM)

	DPH-gefütterte Ratten			Kontroll-Ratten		
	Mittel-wert	Streu-ung	MFM	Mittel-wert	Streu-ung	MFM
spez. Aktivität der ATP-ase in $MgCl_2$-Lösung	1582	± 763	137	2134	± 1335	256
spez. Aktivität der ATP-ase in $MgCl_2$-Lösung + Ouabain	1669	± 613	110	2153	± 1115	214
spez. Aktivität der ATP-ase in $MgCl_2$+$CaCl_2$-Lösung	2105	± 1056	189	2695	± 1615	310
spez. Aktivität der ATP-ase in $MgCl_2$+$CaCl_2$-Lösung + Ouabain	2075	± 914	164	2899	± 1535	295
spez. Aktivität der alkalischen Phosphatase	2213	± 1038	186	3246	± 1811	348
spez. Aktivität der alkalischen Phosphatase + Ouabain	1924	± 994	178	2705	± 1555	299

D.3.2. Prüfung auf Normalität

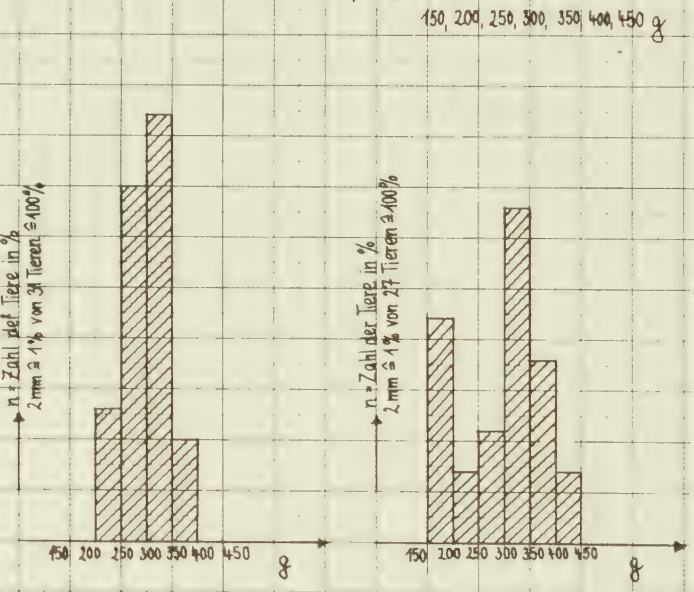
Die statistische Prüfung auf Normalität ergab, daß für alle Parameter mit Ausnahme des Körpergewichtes keine Normalverteilung vorlag.

D.3.3. Graphische Darstellung der Verteilung

Um die Art der Verteilung der einzelnen Meßgrößen zu veranschaulichen, werden sie im Folgenden graphisch dargestellt:

Graphische Darstellung
der einzelnen Hepgrößen = Variable 2-11
innerhalb des DPH-behandelten Kollektivs = L_1 = 31 Ratten
und des Kontroll-Kollektivs = L_2 = 27 Ratten

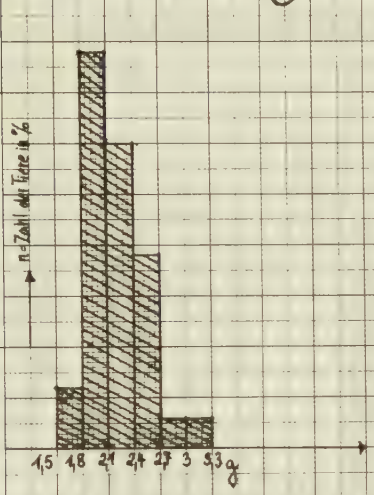
Variable 2 = Körpergewicht in Gramm



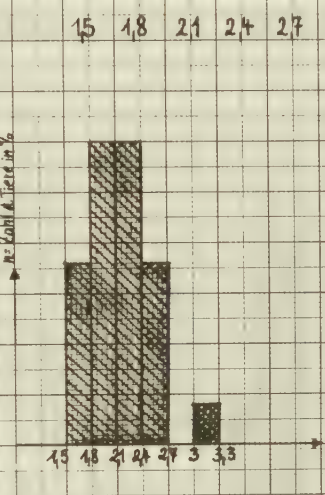
L1 - DPH-Tiere

L2 = Kontroll-Tiere

Variable 3 = Mucosa-Gewicht in Gramm

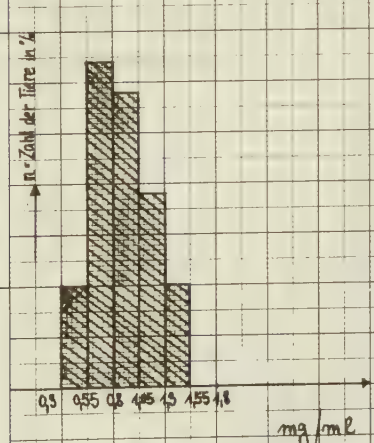


L 1 = DPH-Tiere
n ≙ Zahl der Tiere in %
2mm ≙ 1% von 31 Tieren ≙ 100%

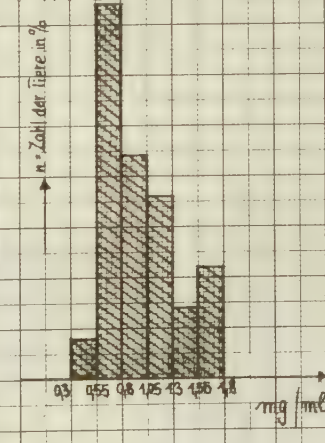


L 2 = Kontroll-Tiere
n ≙ Zahl der Tiere in %
2mm ≙ 1% von 27 Tieren ≙ 100%

Variable 4 = Protein-Konzentration



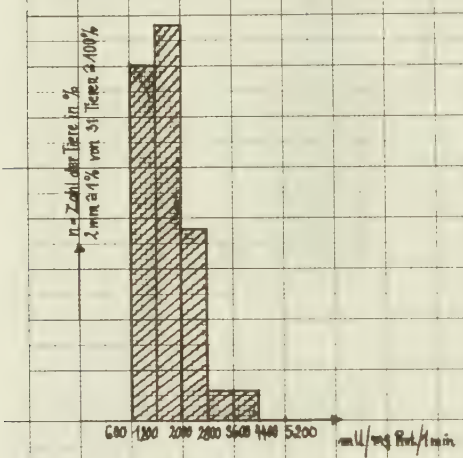
L_1 = DPH-Tiere

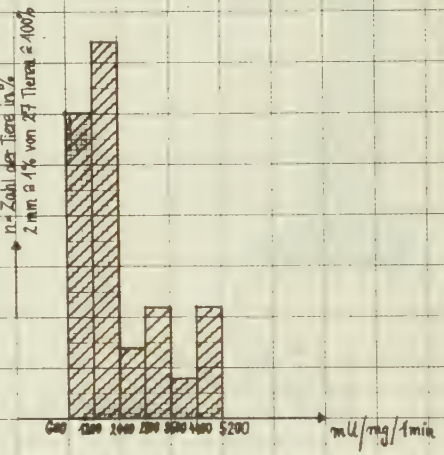


L_2 = Kontrolltiere

Variable 5 = ATPase Aktivität in $MgCl_2$

600, 1200, 2000, 2800, 3600, 4400, 5200 mU/mg Protein/1 min





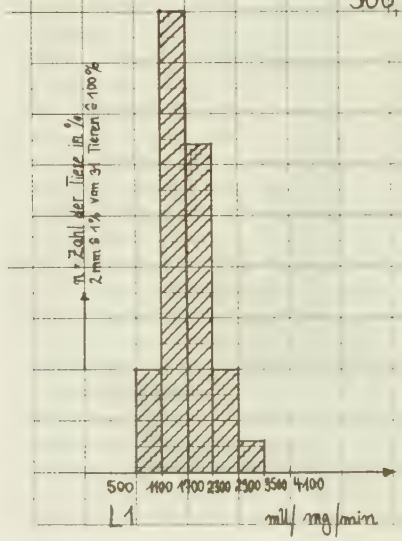
L1 = IPH-Tiere

L2 = Kontroll-Tiere

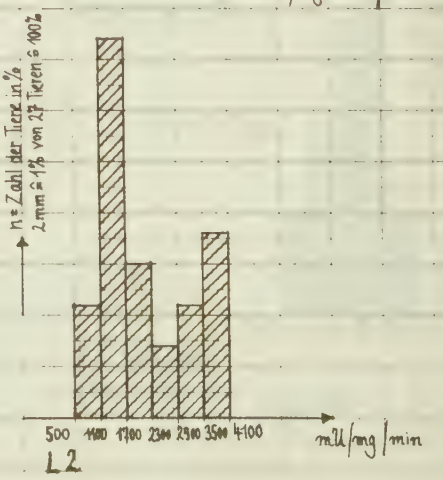
Variable 6 = ATPase Aktivität in $MgCl_2$ + Ouabain

500, 1100, 1700, 2300, 2900, 3500, 4100

mU/mg Protein/1 min



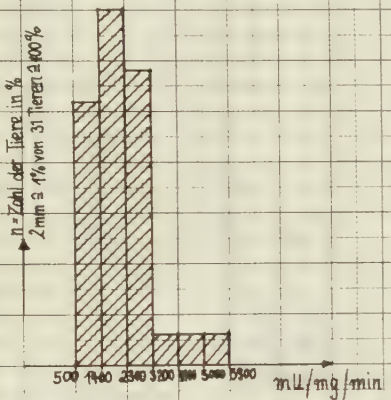
L1

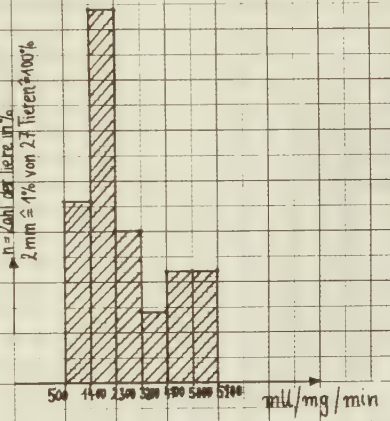


L2

Variable 7 = ATPase Aktivität in $MgCl_2 + CaCl_2$

500, 1400, 2300, 3200, 4100, 5000, 5900 mU/mg Protein/1min



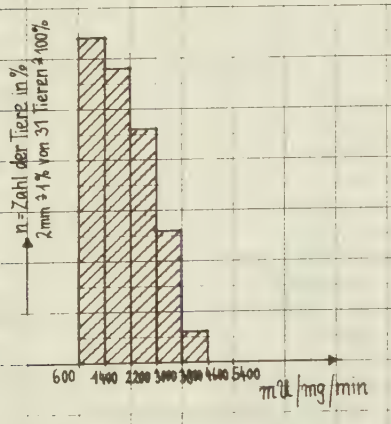


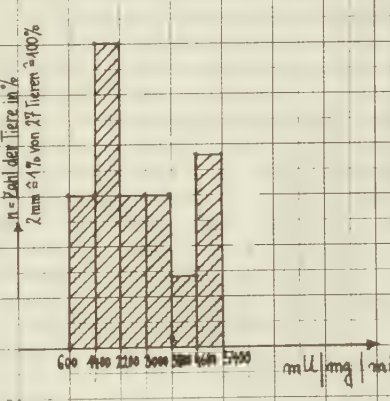
L1 = DPH-Tiere

L2 = Kontroll-Tiere

Variable 8 = ATPase Aktivität in $MgCl_2 + CaCl_2$ + Ouabain

600, 1400, 2200, 8000, 3800, 4600, 5400
mU/mg Prot/1min



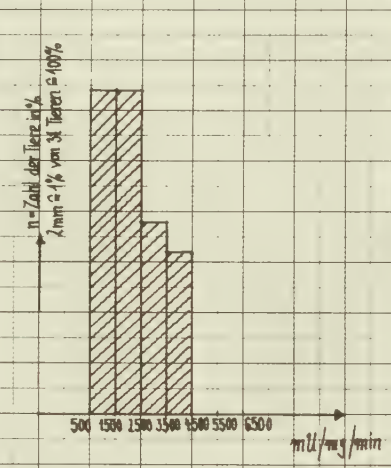


L1 = DPH-Tiere

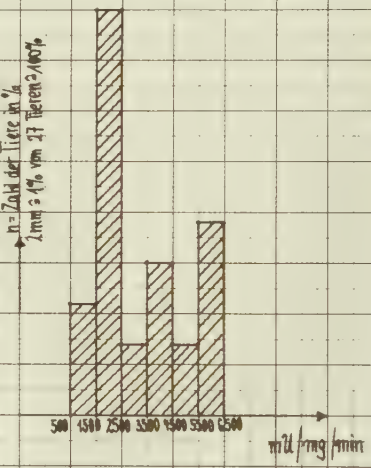
L2 = Kontroll-Tiere

Variable 9 = alkalische Phosphatase-Aktivität

500, 1500, 2500, 3500, 4500, 5500, 6500 mU/mg Protein/1 min



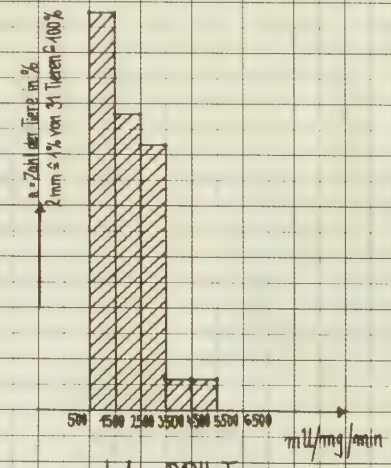
L 1 = DPH-Tiere



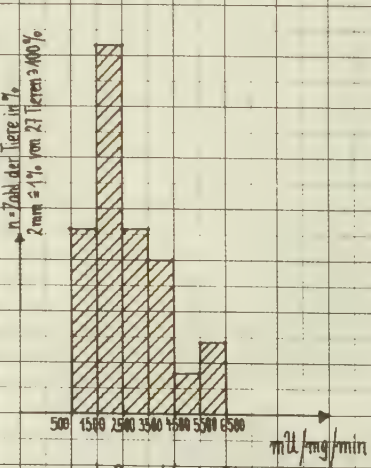
L 2 = Kontrolltiere

Variable 10 = alkalische Phosphatase-Aktivität + Ouabain

500, 1500, 2500, 3500, 4500, 5500, 6500 mU/mg Protein/1 min



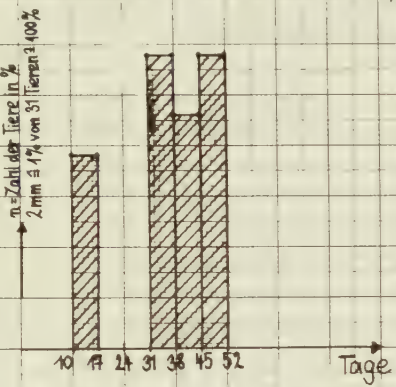
L 1 = DPH-Tiere



L 2 = Kontrolltiere

Variable 11 - Fütterungszeit mit DPH

10; 17; 24; 31; 38; 45; 52 Tage



L1 DPH - Tiere für Kontrolltiere 0-Wert L2

D.3.4. Signifikanzprüfung der Unterschiedlichkeit der Mittelwerte von Versuchs (DPH)- und Kontrollgruppe

Die Mittelwerte der gemessenen Enzymaktivitäten lagen absolut gesehen für die DPH-behandelten Ratten in einem niedrigen Bereich als für die Kontrollratten. Da keine Normalverteilung vorlag, wurden verteilungsunabhängige Signifikanzprüfungen vorgenommen:
Der U-Test nach MANN und WITNEY (VON DER WAERDEN 1957) innerhalb einer Meßreihe zeigte nur für die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase signifikant erniedrigte Werte für die DPH gefütterten Ratten gegenüber den Kontrollratten.
Der WILCOXON-Test für gepaarte Stichproben (PFLANZAGL 1968) wurde auf dem 95 % Niveau durchgeführt. Mit diesem Test konnte gezeigt werden, daß die spezifischen Aktivitäten der ATP-asen im $MgCl_2$+$CaCl_2$-Milieu, im $MgCl_2$-Milieu und mit dem Hemmstoff Ouabain, sowie die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase mit und ohne Ouabain bei den DPH-behandelten Ratten signifikant erniedrigt waren im Vergleich zu den Kontrollratten.

Der WILCOXON-Test berücksichtigt, daß die Ratten paarweise untersucht wurden je ein DPH-Tier und ein Kontrolltier in einem genau parallel laufenden Versuch an verschiedenen aufeinanderfolgenden Tagen. Diese Art der Versuchsdurchführung beinhaltet eine paarweise Abhängigkeit vom Versuchsablauf am Tag "t", der sich vom Versuchsablauf am Tag "t + n" auf Grund möglicher Störfaktoren unterscheiden kann.

Der WILCOXON-Test erbrachte jedoch keinen signifikanten Unterschied für die Differenz der spezifischen Aktivitäten der ATP-asen im $MgCl_2$+$CaCl_2$-Milieu und nur $MgCl_2$-Milieu im Vergleich der DPH-gefütterten Ratten zu den Kontrollratten. Diese Differenz zwischen den spezifischen Aktivitäten der ATP-asen im $MgCl_2$+ $CaCl_2$-Milieu und der spezifischen Aktivität der ATP-

ase allein im $MgCl_2$-Milieu soll nach MELANCON und DE LUCA (1970) die aktuelle spezifische Aktivität der Ca-abhängigen ATP-ase im Dünndarm darstellen.

D.3.5. Rangkorrelations-Test

Zur korrelationsanalyse wurde ein verteilungsunabhängiger Rangkorrelationstest angewandt. Es wurden alle im Abschnitt D.2. aufgeführten Parameter zueinander in Beziehung gesetzt. Die Rangkorrelation wurde mit einer Signifikanz auf dem 95 % Niveau bestimmt.

1. Zwischen dem Körpergewicht und dem Gewicht der gewonnenen Mucosa ergab sich bei allen untersuchten Ratten eine signifikante Korrelation.

2. Zwischen Körpergewicht und Proteinkonzentration in der gereinigten Bürstensaumfraktion sowie zwischen Mucosagewicht und Proteinkonzentration bestand für alle untersuchten Ratten keine Korrelation.

3. Ebenso zeigten sich die spezifischen Enzymaktivitäten für alle Tiere vom Körpergewicht unabhängig.

4. Zwischen den einzelnen Enzymaktivitäten der ATP-asen in den verschiedenen Reaktionsmilieus und der alkalischen Phosphatase zeigte sich für alle Ratten eine signifikante Korrelation.

5. Eine Korrelation zur Dauer der DPH-Verabreichung bestand für die spezifischen Enzymaktivitäten bei den DPH-behandelten Ratten nicht.

6. Auffällig war die Korrelation zwischen den spezifischen Enzymaktivitäten und dem Tag des Versuches = t + n sowohl bei den DPH-behandelten wie bei den Kontrolltieren. Deshalb wurde der WILCOXON-Test für gepaarte Stichproben angewandt. (siehe D.3.4.)

E. Diskussion

E.1. Problematik der tierexperimentellen Versuchsdurchführung an Ratten zum Beweis einer "DPH-Rachitis"

E.1.1. Äußere Veränderungen bei den DPH-behandelten Ratten als Hinweis auf eine rachitische Symptomatik

Das anfangs glänzende, weiße Fell der Ratten wurde im Laufe der Behandlung mit DPH gelblich und stumpf. Bei schwächer entwickelten Tieren trat vereinzelt eine katzenbucklige Haltung auf, ihr Gang wurde schleppend und unbeholfen. Bei der Präparation des Dünndarmes fiel bei einigen DPH-Ratten eine gelbliche Färbung der Mucosa auf. Man kann diese Beobachtungen als Hinweis auf eine rachitische Symptomatik werten. Sie müßte jedoch durch weitere Untersuchungen wie z.B. die Bestimmung des 25-OH-D_3 (=25-OH-CC=25-Hydroxycholecalciferol)- Spiegels im Serum oder durch röntgenologische Untersuchungen bzw. Knochenbiopsien erhärtet werden. Wir haben bei etwa 20 Tieren nach einer Behandlungsdauer von 60 bis 80 Tagen mit DPH Calcium, Phosphor, Gesamteiweiß sowie die alkalische Phosphatase im Serum bestimmen lassen. Diese laborchemischen Werte zeigten keine Veränderung gegenüber den bei Normaltieren erhobenen Werten. Ein blutchemischer Nachweis für eine bestehende Rachitis konnte im Vergleich zu Normaltieren also nicht erbracht werden. Dieser Befund spricht jedoch nicht gegen die Hypothese einer direkten inhibitorischen Wirkung von DPH auf die intestinale Calciumresorption, da zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase im Blut zunächst bekannte Vorgänge in Knochen und Niere regulatorisch wirksam werden (SEIFERT 1975). Eine Dekompensation dieser Regulationsmechanismen mit einer meßbaren Erniedrigung der blutchemischen Werte dürfte sich, wenn überhaupt, erst nach einer längeren Behandlungszeit mit DPH einstellen, als dies in unserem Versuch gegeben war.

E.1.2. Literaturbeispiele für laborchemische und radiologische Veränderungen bei Kindern unter antiepileptischer Langzeittherapie als Hinweis auf eine "Antiepileptica-Rachitis"

In zahlreichen klinischen Studien wird über eine derartige (im vorhergehenden Abschnitt E.1.1. diskutierte) Dekompensation in der Regulation der Calciumhomöostase mit manifesten laborchemisch und radiologisch nachweisbaren Veränderungen berichtet. So beschreibt LÜCKING (1973) ausgeprägte röntgenologisch feststellbare Verkalkungsstörungen mit Demineralisierung des Skeletts bei kaum erniedrigten Serum-Calciumspiegeln jedoch stärker erniedrigten Serumphosphorspiegeln im Falle eines siebenjährigen Jungen, der seit seinem sechsten Lebensmonat unter antiepileptischer Therapie stand (Phenytoin, Primidon, Methylphenobarbital).
Ebenso konnte WINNACKER (1977) in einer Studie an 41 epileptischen Kindern unter einer Kombinationstherapie mit Phenobarbital, Phenytoin und Primidon im Vergleich zu 39 Kontrollkindern eine leichte, jedoch signifikante Erniedrigung der Serumcalcium,- phosphor und -25-OH-D_3-konzentrationen sowie eine signifikante Erhöhung des Serumspiegels der alkalischen Phosphatase feststellen. LIFSHITZ (1973) wies bei 134 Kindern unter antiepileptischer Kombinationstherapie laborchemische und röntgenologische Veränderungen im Sinne einer rachitischen Symptomatik nach. In einer jüngsten Studie beobachtete JUBIZ (1977) bei Patienten unter DPH und/oder Phenobarbitalbehandlung ebenso erniedrigte Plasmaspiegel für 25-OH-D_3, erniedrigte Werte für Calcium und Phosphor im Serum sowie erhöhte Werte für die alkalische Phosphatase im Serum.

E.1.3. Mögliche Nebenwirkungen durch die Gabe von DPH in Äthanollösung

Das Antiepilepticum DPH wurde unseren Versuchsratten

in 2 ml 5 %-igem Äthanolleitungswasser verabreicht. Den Kontrolltieren wurde täglich die gleiche Menge des Lösungsmittels ohne DPH sondiert. Nach den bei SCHMIDT (1975) genannten Untersuchungen von KATER et al. (1969) wurde bei chronischen Alkoholikern eine um etwa sieben Stunden verminderte Halbwertzeit für DPH gefunden, die auf eine durch Äthanol veränderte Hydroxylation von DPH zurückgeführt wird. SCHMIDT konnte in seinen eigenen Versuchen an fünf freiwilligen Versuchspersonen bei Gabe von 1 g/Kg Körpergewicht Äthanol nach einer Einzel-i.v.-Verabreichung von 3 mg/kg Körpergewicht Phenytoin keine Veränderung der Phenytoin (DPH)-Halbwertzeit feststellen. KRAWITT (1973, 1975) untersuchte an Ratten die Wirkungsweise von 20 %-iger Äthanollösung auf den intestinalen Calciumtransport. Er stellte eine Hemmung des Calciumtransportes fest, die durch die Gabe von Vitamin D oder 25-OH-D_3 nicht behoben werden konnte. Die Aktivität einer alkalischen Phosphatase im intestinalen Bürstensaum zeigte sich ebenfalls vermindert, konnte jedoch im Gegensatz zur Calciumresorption durch Vitamin D-Verabreichung behoben werden. Alkalische Bürstensaumphosphatase und Calciumtransport scheinen also unter Äthanoleinfluß unterschiedlich auf Vitamin D zu reagieren. Dies zeigt, daß wichtige Fragen über die Zusammenhänge zwischen intestinaler alkalischer Phosphatase und intestinalem Calciumtransport bezüglich ihrer Vitamin D-Abhängigkeit noch zu klären sind. Eine entscheidende Beeinflussung unserer Ergebnisse in der Aktivitätsbestimmung der alkalischen Bürstensaumphosphatase dürfte aus KRAWITT's Beobachtungen jedoch nicht zu folgern sein. Unsere Äthanolkonzentrationen lagen in wesentlich niedrigeren Bereichen und wurden über eine relativ kurze Zeitdauer verabreicht. Um dennoch eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die diskutierte mögliche Nebenwirkung von Äthanol auszuschließen, wurde den Kontrolltieren das Äthanollösungsmittel in der gleichen Konzentration wie den DPH-behandelten Tieren

sondiert, so daß eine vergleichbare Ausgangsbasis in Darmmilieu und Stoffwechselmetabolismus gewährleistet war.

E.2. Kritische Betrachtungen zu Versuchsaufbau und Ergebnissen

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden die Tierzucht, die Methodik zur Gewinnung der gereinigten Bürstensaumfraktion des oberen Dünndarmdrittels sowie die biochemischen in vitro Messungen der spezifischen Aktivitäten der intestinalen Enzyme ATP-ase und alkalische Phosphatase bereits im Einzelnen beschrieben. Bei einer kritischen Betrachtung des Versuchsablaufes im Detail wird es offensichtlich, daß zahlreiche Fehlerquellen und Störmöglichkeiten darin enthalten sind. Die Komplexität unserer Studie zeigt sich auch darin, daß wir das Antiepilepticum DPH in vivo verabreicht, seine Wirkung jedoch in vitro, in einer sehr speziellen, auf die gereinigte intestinale Bürstensaumfraktion beschränkten Enzymanalyse untersucht haben.

Die in vivo-Verabreichung von DPH beinhaltet eine unterschiedliche individuelle Verarbeitung des Medikamentes DPH bei jedem einzelnen Tier (siehe B.3.3.1. Pharmakokinetik von DPH sowie C.1.2. konstitutionsabhängige Reaktion der Ratten auf DPH in der äußeren Symptomatik).

Für die Gewinnung der gereinigten Bürstensaumfraktion und die in vitro-Enzymanalysen ergaben sich mögliche Fehlerquellen aus feinen Temperaturunterschieden, Zeitschwankungen sowie aus der indirekten Aktivitätsbestimmung der ATP-ase an Hand einer Eichkurve. Ähnliche Schwierigkeiten sind auch in der Arbeit von MELANCON und DE LUCA (1970) bei der Bestimmung einer Ca-abhängigen ATP-ase aus der gereinigten Bürstensaumfraktion des Kükendarmes beschrieben. Wir versuchten diese Fehlerquellen dadurch auszugleichen,

daß wir jeweils ein DPH-behandeltes Tier und ein Kontrolltier in einem exakt parallel verlaufenden Versuch testeten, alle Messungen dreifach durchführten und als Endergebnis den Mittelwert bestimmten. Zusätzlich wurde ein statistisches Verfahren angewandt, das diese paarweise Untersuchung berücksichtigt (siehe D.3.4. statistische Auswertung). Damit konnten wir trotz des relativ kleinen Kollektivs an DPH-behandelten Ratten und Vergleichsratten auch in Anbetracht der oben genannten Schwierigkeiten signifikante Ergebnisse verzeichnen.

E.2.1. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme alkalische Phosphatase und Mg, Ca-abhängige Phosphatase in der intestinalen gereinigten Bürstensaumfraktion

Die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase in der intestinalen gereinigten Bürstensaumfraktion war bei den DPH-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten signifikant erniedrigt.

Für die ATP-asen ergab sich sowohl im $MgCl_2$+$CaCl_2$-Reaktionsmilieu wie im reinen $MgCl_2$-Reaktionsmilieu eine signifikante Aktivitätsverminderung bei den DPH-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten, wobei die Absolutwerte im $MgCl_2$-Milieu niedriger lagen als im $MgCl_2$+$CaCl_2$-Milieu. Die aus den spezifischen Aktivitäten der ATP-ase im $MgCl_2$+$CaCl_2$-Milieu und nur $MgCl_2$-Milieu gebildete Differenz soll nach MELANCON und DE LUCA (1970) die aktuelle spezifische Aktivität einer Ca-abhängigen ATP-ase darstellen. Wir konnten für diese Differenz, also die aktuelle Aktivität einer hypothetischen Ca-abhängigen ATP-ase keine signifikante Aktivitätsverminderung bei den DPH-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten feststellen.

E.2.2. Die Rangkorrelationsuntersuchung ergab für die einzelnen Enzymaktivitäten der ATP-asen in den verschie-

denen Reaktionslösungen untereinander sowie auch für ATP-asen und alkalische Phosphatase generell eine signifikante Korrelation. Dieses Ergebnis spricht für die von HAUSSLER (1970), HOLDSWORTH (1970) und KRAWITT (1973) vertretene Ansicht, daß diese beiden Aktivitäten Komponenten eines einzigen Enzymproteinkomplexes darstellen oder sogar als verschiedene Aktivitäten eines einzigen Proteins zu werten sind.
Eine Korrelation der spezifischen Enzymaktivitäten zur Dauer der DPH-Verabreichung bestand nicht. Dieses Ergebnis spricht für die bei KOCH (1972) vertretene Ansicht, daß eine direkte Wirkung von DPH am Darm von Dauer und Dosis dieses Medikamentes relativ unabhängig ist.

Die Korrelation zwischen den spezifischen Enzymaktivitäten und dem Tag des Versuches verdeutlicht die im gesamten Versuchsaufbau enthaltenen Störfaktoren. Sie bestätigt die berechtigte Anwendung statistischer Methoden für gepaarte Stichproben und demonstriert, daß weitere spezielle in vitro Versuche notwendig sind, um die vorliegenden Ergebnisse zu verifizieren.

E.2.3. Hypothetische alkalische Phosphatase und Mg, Ca-ATP-ase im intestinalen Calciumtransport

KRAWITT (1973) beobachtete in seinen Untersuchungen über die alkalische Bürstensaumphosphatase von Ratten unter Calcium-Restriktion eine ansteigende Aktivität dieses Enzyms. Er brachte diesen Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase mit einem Prozeß zur adaptiven Steigerung der intestinalen Calciumresorption in Zusammenhang. Der Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase beschränkte sich auf das Duodenum. Für die ATP-ase konnte KRAWITT keinerlei Aktivitätsveränderung feststellen. Nach seinen Untersuchungen wäre im Falle einer Hemmung der intestinalen Calciumresorption durch DPH auch eine stärkere Verminderung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase denkbar.

KRAWITT stellt die Teilnahme der alkalischen Phosphatase an einem aktiven Calciumresorptionsprozeß in Frage. Er beruft sich auf die Experimente von SCHACHTER (1966) und vertritt die Ansicht, daß die alkalische Phosphatase vielleicht in Form der erleichterten Diffusion an der Aufnahme von Calcium an der Mucosaoberfläche der Darmzelle teilnimmt. Zur Funktion der ATP-ase in diesem Prozeß macht KRAWITT keine definitive Aussage, da er in seinen Versuchen keine sichtbare Veränderung weder für eine Ca-abhängige noch für eine Mg-abhängige ATP-ase feststellen konnte. Er schränkt seine Befunde jedoch dahingehend ein, daß er die Schwierigkeit betont, die Enzymaktivität der ATP-ase unter Verwendung von ATP als Substrat zu messen.

Unsere Untersuchungen dagegen zeigen eine Reaktion der Mg, Ca-abhängigen ATP-ase unter DPH-Medikation. Sie stimmen darin überein mit den für unsere Studie grundlegenden Untersuchungen von MARTIN, MELANCON und DE LUCA (1969) über die Vitamin D-Stimulierbarkeit einer Ca-abhängigen ATP-ase des Rattendünndarmes. Diese Autoren vertreten die Ansicht, daß die initiale Calciumresorption über die Bürstensaumoberfläche des Duodenums ein sauerstoffabhängiger, Vitamin D-stimulierbarer Prozeß ist, der durch einen "carrier" vermittelt wird. Die genaue Funktion der hypothetischen Ca-abhängigen ATP-ase in diesem Prozeß wird nicht beschrieben, jedoch der Nachweis erbracht, daß diese Ca-abhängige ATP-ase bei Vitamin D-Mangelratten erniedrigt war oder ganz fehlte. Differenziertere Hypothesen zur Funktion der ATP-ase im intestinalen Calciumtransport finden sich bei OMDAHL (1973), dessen Modellvorstellung bereits im theoretischen Teil (B.2. 3.) erwähnt wurde.

E.2.4. In vitro Hemmversuche mit Ouabain

Unsere in Vitro Hemmversuche mit Ouabain, bekannt als spezifischer Inhibitor von Na, K-ATP-asen, stützen die

bei OMDAHL (1973) vertretene Ansicht, daß zwei verschiedene ATP-ase-Systeme bei der Calciumresorption an der luminalen Seite der Mucosazelle und bei der Calciumexkretion an der Serosaseite zur Wirkung kommen. In den Calciumresorptionsprozeß soll eine Ca-abhängige ATP-ase, in den Calciumexkretionsprozeß dagegen eine Na, K-abhängige ATP-ase involviert sein. Da wir in unseren Versuchen gereinigte Bürstensäume testeten, also die luminale Seite der Mucosazelle, dürfte Ouabain theoretisch keinen Einfluß auf die spezifischen Aktivitäten unserer untersuchten Enzyme haben. Für die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase lagen die Mittelwerte unter Zusatz von Ouabain in etwas niedrigeren Bereichen. Dieses Ergebnis kann mit der bisher bekannten Wirkungsweise von Ouabain nicht erklärt werden. Für die spezifischen Aktivitäten der ATP-asen ergab sich im $MgCl_2$-Milieu eine minimale Erhöhung der Aktivitäten unter Zusatz von Ouabain, im $CaCl_2$+ $MgCl_2$-Milieu keine eindeutige Veränderung der Aktivitäten. Eine Aktivitätsminderung unter Zusatz von Ouabain wäre auf eine Restaktivität von verschiedenen Na, K-ATP-asen in der Bürstensaumfraktion zurückzuführen. Eine Restaktivität, die von Proteinen der Basalmembran stammt, würde für eine "Verunreinigung" der Bürstensäume sprechen. Es können jedoch auch andere Na, K-ATP-asen, die ebenfalls im Bürstensaum lokalisiert sind aber nicht mit dem Calciumtransport in Verbindung stehen (z.B. ATP-asen für den aktiven Zuckertransport) eine derartige Restaktivität erzeugen.

Insgesamt gesehen ergaben die Teste mit Zusatz von Ouabain bezüglich unserer speziellen Problemstellung der Aktivitätsminderung durch DPH ein in das Gesamtergebnis der Untersuchung passendes Bild: Die spezifischen Enzymaktivitäten der alkalischen Phosphatase und der ATP-asen in den verschiedenen Reaktionslösungen lagen auch mit Zusatz von Ouabain für die DPH-behandelten Ratten in signifikant niedrigeren Bereichen als für die Kontrollratten.

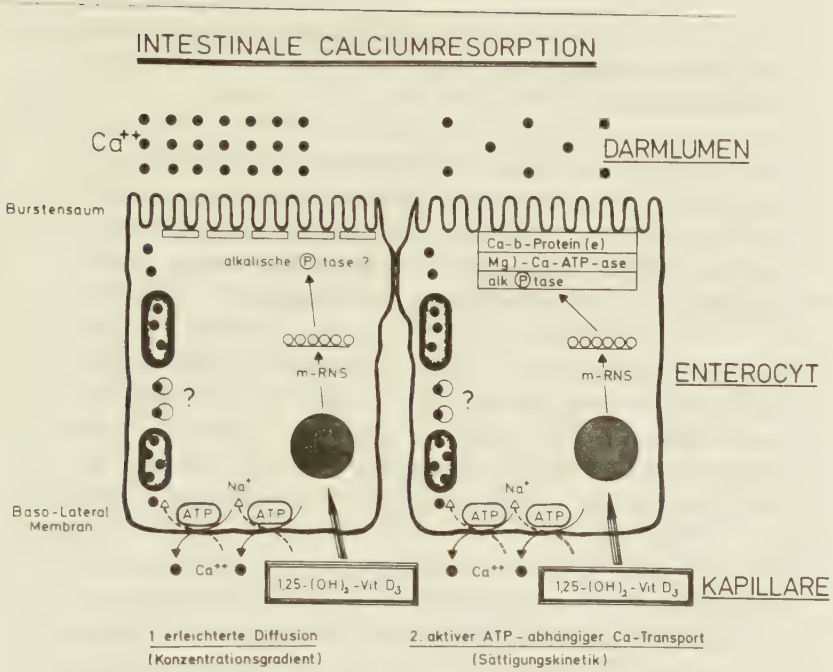
E.3. Die Ergebnisse im Vergleich zu einzelnen Hypothesen über die Pathogenese der Antiepileptica-Osteomalazie

Nachdem unsere Studie eine kombinierte in vivo, in vitro Untersuchung ist, können wir keine definitive Aussage zur Pathogenese der Antiepileptica-Osteomalazie vorlegen.
Wir haben DPH in vivo verabreicht, deshalb ist nicht auszuschließen, daß es seine inhibitorische Wirkung auf die intestinalen Enzymaktivitäten über eine Störung des Vitamin D-Metabolismus entfaltet. Eine Enzyminduktion wie sie von zahlreichen Autoren als Erklärungsmodell für die Entstehung einer Antiepileptica-Osteomalazie angeführt wird (SWOBODA 1976, CHRISTIANSEN 1975, HAHN 1972) ist demzufolge auch für unser DPH-behandeltes Rattenkollektiv nicht auszuschließen. Ein manifester Vitamin D-Mangel wurde in unserem Versuch nicht nachgewiesen, wenngleich die äußeren Veränderungen einiger DPH-behandelter Tiere dem Bild eines Vitamin D-Mangels entsprachen. MÜNCH (1975) definiert in Übereinstimmung mit SCHREIER (1976) die Antiepileptica-Rachitis als eine Form der Vitamin D-Mangel-Rachitis. Er betont die multifaktorielle Genese dieses Vitamin D-Mangels bei der antiepileptischen Osteomalazie und beruft sich auf die Arbeiten von STAMP (1974) und SCHAEFER (1973). Als pathogenetische Faktoren nennt er eine Enzyminduktion in der Leber, eine vermehrte Ausscheidung von Vitamin D und seinen Metaboliten in der Galle (STANBURY 1972) und eine Hemmung der intestinalen Calciumabsorption unter dem Einfluß von DPH (CASPARY 1972, KOCH 1972). Zu dem letztgenannten Punkt muß jedoch gesagt werden, daß der eindeutige Beweis für eine direkte Hemmung durch DPH in loco an der Darmzelle oder deren Proteinen bis jetzt noch nicht erbracht ist. Zur Enzyminduktionstheorie als pathogenetischer Faktor muß für unsere Studie einschränkend erwähnt werden, daß DPH bei alleiniger Gabe weit weniger potent in seiner Enzyminduktion ist als in der kombinierten Verabreichung

mit Phenobarbital als einem seit langem bekannten potenten Induktor verschiedener Leberenzyme (BOWDEN 1974). Stellt man dagegen als Primärwirkung von DPH seine Störung der intestinalen Calciumresorption in den Vordergrund, so wäre unter dem Aspekt des Regelkreises (SEIFERT 1975) die Störung des Vitamin D-Metabolismus bzw. der Vitamin D-Mangel eine sekundäre Dekompensation eines entscheidenden Regulationsprinzips zur Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase im Blut. Für eine Primärwirkung von DPH am Darm und gegen obige Enzyminduktionstheorie sprechen auch die Untersuchungen von HERRATH (1972) die eine verminderte Calciumresorption an Ratten unter DPH ohne eine nennenswerte Beeinträchtigung des Vitamin D-Metabolismus beobachtete. Auch CORRADINO (1976) stellt die Wirkung von DPH am Darm in den Vordergrund. Er kommt in seinen beeindruckenden in vitro Untersuchungen unter Verwendung von embryonalem Kükenduodenum in einem organischen Kulturmedium zu folgenden Ergebnissen: DPH zeigte einen direkten Hemmeffekt auf den Vitamin D vermittelten Calciumabsorptionsmechanismus, wobei die duodenalen CaBP (= calcium-binding-protein) und cAMP (= cyclisches Adenosin Monophosphat) - Konzentrationen abfielen und die Calciumaufnahme durch das Darmgewebe in einer dosisunabhängigen Form vermindert war. CORRADINO leitet aus diesen Beobachtungen die Hypothese ab, daß Anticonvulsiva und speziell DPH verschiedene Wirkungsmöglichkeiten beim Tier haben und nur zum Teil, wenn überhaupt, mit einem medikamentös induzierten beschleunigten Abbau von Vitamin D zusammenhängen.

Über die spezielle Wirkungsweise von DPH auf Enzymsysteme in der Darmwand finden sich in der derzeitigen Literatur nur wenig konkrete Aussagen. WOLFF (1975) untersuchte die Wirkung von DPH in vitro auf die Mg-ATP-ase, Ca-ATP-ase und alkalische Phosphatase in der isolierten Bürstensaumfraktion des Rattenjejunums und in vivo auf die intestinale Calciumre-

sorption. Er stellte keine Wirkung auf die Mg-ATP-ase fest, jedoch eine Steigerung der Aktivität der Ca-ATP-ase, die er als Mg-ATP-ase unter Zusatz von Ca-Ionen definierte. Die alkalische Phosphatase wurde geringgradig gehemmt. Parallel zu der in vitro-Aktivierung dieser Ca-ATP-ase beobachtete er in vivo eine Stimulation der Calciumresorption unter einer aktuellen Verabreichung von DPH. Im Gegensatz dazu haben CASPARY (1972) und KOCH (1972) allerdings nach Langzeitbehandlung mit DPH eine Verminderung der Calciumresorption gefunden. WOLFF folgert aus seinen Untersuchungen, daß wahrscheinlich nur diese Ca-abhängige ATP-ase und nicht die alkalische Phosphatase an dem Transport von Calcium durch die mikrovilläre Membran beteiligt ist und DPH im aktuellen Experiment die Calciumresorption durch Aktivierung einer Ca-ATP-ase steigert. Mit ersterer Behauptung steht er im Widerspruch zu den Untersuchungsergebnissen von HAUSSLER (1970), HOLDSWORTH (1970) und KRAWITT (1973), nach denen die beiden intestinalen Enzymsysteme alkalische Phosphatase und Mg, Ca-ATP-asen eher einem gemeinsamen Enzymkomplex zuzuordnen wären. Bezüglich seiner zweiten Schlußfolgerung kamen THANNER, STRÖDER et al (persönliche Mitteilung, Literatur in Vorbereitung) zu einem völlig anderen Ergebnis: Sie stellten ebenfalls an Rattenbürstensäumen in reinen in vitro Versuchen eine direkte, konzentrationsabhängige Hemmung sowohl der alkalischen Phosphatase wie der Mg, Ca-abhängigen ATP-asen durch DPH fest. Dabei änderte sich vor allem das kinetische Verhalten der ATP-asen sehr eindrucksvoll unter der Anwesenheit von DPH im Reaktionsmilieu. Diese Ergebnisse sprechen für einen lokalen Hemmeffekt von DPH auf wichtige Enzyme, die am intestinalen Calciumresorptionsprozeß beteiligt sein sollen. THANNER stellt seine Hypothese zum Ca-Resorptionsprozeß in folgendem Schema dar:



Die von WOLFF (1975) beobachtete Aktivierung einer Ca-abhängigen ATP-ase durch DPH erscheint im Vergleich zu THANNERs Untersuchungen auch deshalb fragwürdig, da WOLFF die Aktivität dieser Ca-ATP-ase nur bei einer ATP-Konzentration von 2 mM als Substratangebot getestet hat. THANNER dagegen führte seine kinetischen in vitro Versuche mit steigenden Substratangeboten an ATP (0,1 mM - 5 mM) durch. Dabei fand er eine Erhöhung der Differenz von Mg+Ca-ATP-ase-Mg-ATP-ase, die jedoch rein auf eine Hemmung der Mg-ATP-ase zurückzuführen war. Da WOLFF seine Untersuchungen nur mit 2 mM ATP durchgeführt hat, konnte er nach THANNERs Meinung vermutlich gar nicht auf die starke Veränderung des kinetischen Verhaltens der Enzymaktivitäten im DPH-Milieu kommen. Außerdem sollte man auf Grund von THANNERs Studien Mg-abhängige und Ca-abhängige ATP-asen nur bedingt als selbstständige Aktivitäten betrachten, da es sich bei diesen Enzymen auch um ein

und das selbe Enzymprotein mit verschiedenen absoluten Aktivitäten in den einzelnen Reaktionsmilieus handeln könnte.

Die vorliegende Studie stützt THANNERs Ansicht, nur von einer Ca+Mg-abhängigen ATP-ase zu sprechen, da wir speziell für die von MELANCON und DE LUCA (1970) postulierte Ca-abhängige ATP-ase keine Aktivitätsminderung durch DPH feststellen konnten.

Nachdem unsere Untersuchung jedoch eine kombinierte in vivo in vitro Studie war, können wir sie auch zu den Hypothesen in Vergleich stellen, nach denen sich DPH über komplexere Mechanismen indirekt hemmend auf die intestinale Calciumresorption auswirkt.

Bereits nach einer relativ kurzen Zeit der Verabreichung von DPH konnten wir eine Verminderung der spezifischen Enzymaktivitäten von alkalischer Phosphatase und Mg, Ca-abhängiger ATP-ase in der gereinigten Bürstensaumfraktion feststellen. Diese Aktivitätsverminderung kann nicht nur durch eine direkte Hemmung an den entsprechenden Enzymen erklärt werden, ebensowenig wie die bei CORRADINO (1976) festgestellte Verminderung der Konzentration des CaBP (Calcium bindendes Protein) in den gezüchteten Zellen von embryonalen Kükenduodenum. Weiterhin wurde in unserem Versuch ein Anreicherungsverfahren durchgeführt, das es unwahrscheinlich macht, daß der mögliche Hemmstoff DPH sich noch am Ort seiner Hemmwirkung befindet. Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, daß die Verminderung der spezifischen Enzymaktivitäten allein auf die direkte Hemmung obiger Enzymproteine am Zielorgan zurückzuführen ist. Abgesehen von der immer noch diskutierten indirekten Beeinflussung der Enzymproteine des intestinalen Calciumresorptionsgeschehens durch Änderung der Homöostase der regulierenden Vitamin D-Metaboliten, wäre als weitere Erklärung eine direkte Interaktion von DPH am Zellkern des Enterozyten denk-

bar. DPH könnte durch die Repression bestimmter Gene, die für die Bildung calciumresorptionsfördernder Proteine zuständig sind, oder auch durch die Induktion einer Imbalanz bestimmter zellulärer Mediatoren wie z.B. c-AMP zu der in unserem Versuch beobachteten Enzymaktivitätsverminderung führen.
Eine weitere hypothetische Modellvorstellung zur Wirkungsweise von DPH stützt sich auf die Arbeit von DEUPREE (1977) über das Verhalten von DPH an neuronalem Gewebe. DEUPREEs in vitro Versuche weisen darauf hin, daß DPH an synaptischen Vesikeln eine Mg-ATP-ase hemmt. Desweiteren soll DPH die passive Diffusion von Natrium in stimulierten Nervenzellen teilweise blockieren. Demzufolge könnte DPH auch an der Mucosazelle des Darmes hypothetische für Calcium diffundierbare Kanäle blokkieren. Wenn das intestinale alkalische Phosphatase-ATP-ase-System im Sinne einer erleichterten Diffusion bei der Calciumresorption wirksam wird (PIAZOLO 1973, SCHACHTER 1966, URBAN 1969, SCHEDL 1968) indem es durch Bereitstellung von Energie die Lipidstrukturen der Zellmembran verändert (GOODMAN, HAUSSLER 1972) könnten dadurch für Calcium diffundierbare Kanäle geöffnet werden. Durch eine hemmende Interaktion von DPH auf das oben genannte Enzymsystem würde damit auch die Energiefreisetzung zur Öffnung derartiger Kanäle gehemmt und dadurch eine Calciumresorption zumindest über den Mechanismus der erleichterten Diffusion erschwert.

Dies sind Modellvorstellungen, die aus unseren Ergebnissen und den derzeit bekannten Hypothesen zur Wirkungsweise von DPH resultieren. Sie stellen zum Teil noch sehr theoretische Arbeitshypothesen dar, die jedoch für weitere Untersuchungen über die Interaktion zwischen DPH und dem alkalische Phosphatase-ATP-ase-System der duodenalen Bürstensaumfraktion in seiner Bedeutung für den intestinalen Calciumtransport neue Impulse geben könnte.

E.4. Zusammenfassung der möglichen Interaktionen von DPH mit dem intestinalen Calciumtransport

1. indirekte Hemmwirkung:

   a. durch Mangel an $1,25(OH)_2D_3$, sowie anderen aktiven Vitamin D-Metaboliten

      . durch Induktion hepatischer Enzyme, die für eine Verminderung aktiver Vitamin D-Metaboliten verantwortlich sind oder einen Anstieg inaktiverer Vitamin D-Metaboliten z.B. $24,25(OH)_2D_3$ bewirken.

      . durch die noch nicht untersuchte Möglichkeit der Beeinflussung der Hydroxylierung von $25(OH)D_3$ in der Niere

      . durch Interaktion mit einem Schritt in der Parathormonbildung oder der Parathormonwirkung im Calciumstoffwechsel

   b. durch vermehrte Ausscheidung von Vitamin D-Metaboliten z.B. über die Galle.

2. direkte Hemmwirkung:

   durch die direkte Hemmung auf eine vorhandene Aktivität von Enzymproteinen, die am intestinalen Calciumtransport beteiligt sind; d.h. es ist genügend Enzymaktivität vorhanden, sie kann jedoch durch die Anwesenheit von DPH nicht voll zur Wirkung kommen.

3. direkte Beeinflussung der Proteinbiosynthese von am intestinalen Ca-Transport beteiligten Enzymen (molekular biologischer Effekt)

   a. durch Interaktion im Zellkern, z.B. Störung der DNA bzw. RNA - Biosynthese

b. durch Störung der Transscriptionsphase, in der die Übertragung der in der DNA gespeicherten genetischen Information auf die m-RNA stattfindet.

c. durch Störung der Translationsphase, in der die genetische Information unter Beteiligung der Ribosomen und durch spezifische Wechselwirkung von m-RNA und Aminoacetyl-t-RNA in die entsprechende Proteinstruktur übersetzt wird (BUDDECKE 1974).

4. indirekte Beeinflussung molekularbiologischer Vorgänge:

durch Beeinflussung von Regulationsvorgängen, welche

a. die Proteinbiosynthese selbst, also Transscription oder Translation betreffen,

b. lediglich die Funktion eines bereits vorhandenen Enzymproteins beeinflussen.

ad B.
nach BUDDECKE (1974) kann durch hormonelle Aktivierung von Zyclo-AMP (3', 5'-AMP) dieses wiederum als allosterischer Aktivator auf Enzyme wirken, die durch eine ATP-abhängige Phosphorylierung nachgeordnete Enzyme in ihrer Aktivität steigern oder hemmen (Kinasen). Außerdem vermag Zyclo-AMP über einen noch nicht geklärten Mechanismus zu einer unmittelbaren Steigerung der Zellpermeabilität führen.
FERENDELLI (1977) wies an Synaptosomen den Einfluß von DPH auf Ca-Permeabilität und zyklische Nukleotide (c-AMP, c-GMP) nach. Demnach wäre eine ähnliche Wirkung von DPH an der Mucosazelle des Darmes ebenso denkbar.

F. Zusammenfassung

Seit 1968 ist bekannt, daß Kinder unter antiepileptischer Langzeittherapie eine Symptomatik entwickeln können, die dem klinischen Bild einer Vitamin D-Mangelrachitis entspricht. In der vorliegenden Arbeit wird über die Wirkung des in der antiepileptischen Therapie sehr häufig verwendeten Antiepilepticums Phenytoin (DPH) auf Enzymsysteme, die am intestinalen Calciumtransport beteiligt sein sollen, berichtet. Die kombinierte in vivo, in vitro Untersuchung wurde an 31 Ratten, die mit dem Antiepilepticum DPH behandelt wurden, vorgenommen. Als Vergleichsgruppe diente ein Kollektiv von 27, nur mit dem Lösungsmittel von DPH behandelten Ratten. Wir bestimmten die spezifischen Enzymaktivitäten der alkalischen Phosphatase und der Mg, Ca-abhängigen ATP-ase in der gereinigten Bürstensaumfraktion des Rattenduodenums. Die Aktivität der ATP-ase wurde in einem $MgCl_2$+$CaCl_2$-Reaktionsmilieu, sowie in einem Milieu, das nur $MgCl_2$ enthielt, gemessen. Die Differenz dieser beiden spezifischen Enzymaktivitäten soll die Aktivität der aktuellen Ca-abhängigen ATP-ase in der duodenalen gereinigten Bürstensaumfraktion darstellen. Außerdem wurde die spezifische Enzymaktivität sowohl der alkalischen Phosphatase wie auch der Mg, Ca-abhängigen ATP-ase unter Zugabe des für Na, K-ATP-asen spezifischen Hemmstoffes Ouabain (g-Strophantin) in vitro gemessen. Für beide Enzyme konnten wir in allen aufgeführten Reaktionslösungen bei den DPH-behandelten Ratten eine signifikante Verminderung der spezifischen Enzymaktivitäten feststellen. In Anbetracht der relativ kurzen Behandlungszeit mit DPH (zwischen 10 und 53, im Mittel 33 Tagen) unterstützen unsere Ergebnisse die Hypothese, daß DPH eine direkte Störung im Calciumresorptionsmechanismus des Duodenums bewirkt, und die Dauer und Intensität der DPH-Behandlung nicht von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung einer Antiepileptica-Rachitis sein dürfte.

Um definitive Aussagen zur Pathogenese der Antiepileptica-Rachitis unter DPH-Therapie zu machen, sind biochemische

Enzymanalysen, elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Calciumtransport im Duodenum, in vitro Hemmversuche mit verschiedenen DPH-Konzentrationen, sowie Langzeitstudien mit DPH an größeren Tierkollektiven erforderlich. Die mögliche Interaktion von DPH mit den hormonellen Regulationsfaktoren des Calciumstoffwechsels, speziell mit dem Vitamin D-Metabolismus ist ebenso noch ein ungeklärtes Problem und bedarf weiterer umfassender gezielter Untersuchungen.

G: Anhang

G.1. EINZELERGEBNISSE

Kontr. Ratten	Nr.	Körp. Gew. (g)	Muc. Gew. (g)	Prot. Konz. mg/ml	ATP-ase in $MgCl_2$ mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$+Ouab. mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$,$CaCl_2$ mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$ $CaCl_2$+Ouabain mU/mg/min	alk.Phos. mU/mg/min	alk.Phos. + Ouabain mU/mg/min
	1	200	1,5	1,5	4740	3700	5940	4380	3590	3695
	2	270	1,8	1,73	5560	3802	6000	5780	7280	7420
	3	235	1,8	0,59	4661	3983	6525	4661	5175	4580
	4	275	2,2	1,1	3773	3182	4068	3568	3688	3340
	5	310	2,0	0,72	1736	2015	2538	3485	2400	2240
	6	265	2,05	0,94	3457	3883	4255	5426	5780	4100
	7	280	2,6	0,89	2781	3315	4213	5506	6453	5770
	8	275	2,0	0,89	1685	1573	2135	2753	2550	1538
	9	295	2,0	0,49	3570	4390	4280	5500	5510	3310
	10	375	2,2	0,74	1850	2360	2638	3240	4380	2918
	11	275	2,2	0,68	1540	1470	2060	3305	2185	1788
	12	335	2,3	0,88	2955	3470	3805	4600	6450	4140
	13	325	2,2	0,76	1645	1711	2664	2829	4520	3840
	14	215	2,2	1,14	920	1272	1579	1800	2105	2500
	15	275	2,1	1,12	960	1162	1250	1608	1750	1735
	16	200	2,5	1,13	1062	1018	1637	1770	2168	1748
	17	245	2,2	0,92	924	978	978	1060	1352	1075

Kontr. Ratten	Nr.	Körp. Gew. (g)	Muc. Gew. (g)	Prot. Konz. mg/ml	ATP-ase in $MgCl_2$ mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$+Ouab. mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$,$CaCl_2$ mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$ $CaCl_2$+Ouabain mU/mg/min	alk.Phos. mU/mg/min	alk.Phos. + Ouabain mU/mg/min
	17	245	2,2	0,92	924	978	978	1060	1352	1075
	18	315	2,5	0,73	1370	1268	1750	1712	1296	964
	19	440	2,1	0,70	1072	1142	1428	1573	2308	2043
	20	310	2,6	0,80	1120	1250	1438	1250	1350	1182
	21	95	2,1	0,56	1205	1250	1340	1608	1930	1596
	22	90	1,8	0,76	1118	1151	1710	1315	1895	1660
	23	95	1,6	1,16	1443	1660	1790	2034	1863	1398
	24	105	2,3	0,97	852	1005	980	1082	1532	1115
	25	120	2,5	1,71	1420	1798	1346	1638	1708	1582
	26	90	1,9	1,73	1878	2425	1835	2458	2800	2808
	27	275	3,3	1,54	2321	1916	2597	2354	3633	2966

DPH-Ratten	Nr.	Körp. Gew. (g)	Muc. Gew. (g)	Prot. Konz. mg/ml	ATP-ase in $MgCl_2$ mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$+Ouab. mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$,$CaCl_2$ mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$ $CaCl_2$+Ouabain mU/mg/min	alk.Phos. mU/mg/min	alk.Phos. + Ouabain mU/mg/min	DPH-Tage
	1	170	2,0	1,52	4046	3388	5099	4276	4180	3558	40
	2	200	1,8	1,37	3175	2518	4562	3467	3880	3460	41
	3	250	1,9	1,09	2638	2438	3624	2844	3099	2620	42
	4	275	2,0	0,80	2281	1937	2847	2094	2198	1559	43
	5	240	2,4	0,86	1599	1773	2238	3025	2450	2515	44
	6	310	2,5	1,14	2286	2564	3034	3483	3142	2888	45
	7	285	2,4	0,68	2059	2279	3088	3603	3028	2583	46
	8	255	2,2	0,73	1233	1164	1575	2808	1482	1125	47
	9	220	2,0	0,30	6670	1000	8330	1166	4500	3650	48
	10	300	2,1	0,74	2027	1757	2297	2095	2920	1620	49
	11	290	2,2	0,95	1395	1500	2684	2605	3680	3018	50
	12	260	2,2	1,17	983	1154	1496	1668	1618	1388	51
	13	325	2,3	0,76	1382	1151	1678	1349	1422	1140	52
	14	200	2,4	0,93	1224	1425	1828	1667	1688	1599	53
	15	290	2,5	0,60	2166	2166	2958	2666	2960	2250	53
	16	250	3,2	1,43	1119	1276	1871	1434	2320	2125	33
	17	225	2,1	1,02	1667	1838	2304	2377	1786	2180	34

DPH-Ratten	Nr.	Körp. Gew. (g)	Muc. Gew. (g)	Prot. Konz. mg/ml	ATP-ase in $MgCl_2$ mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$+Ouab. mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$,$CaCl_2$ mU/mg/min	ATP-ase in $MgCl_2$ $CaCl_2$+Ouabain mU/mg/min	alk.Phos. mU/mg/min	alk.Phos. + Ouabain mU/mg/min	DPH-Tage
	18	205	2,1	1,05	1238	1405	1452	1929	1540	1620	34
	19	310	2,5	1,09	1239	1308	1400	1330	1735	1239	35
	20	295	2,4	0,91	1788	1869	2304	1128	3018	2760	35
	21	280	2,1	0,51	1078	2225	1176	1371	1166	954	35
	22	255	2,2	0,82	1037	1190	1220	1342	1285	1186	36
	23	270	2,5	0,76	988	1282	1184	1315	1173	1089	36
	24	280	2,6	0,61	410	508	574	614	665	488	36
	25	220	2,5	1,00	1972	2275	2950	3000	4080	4540	10
	26	205	2,0	1,15	1198	1302	1610	1653	1910	1740	12
	27	220	2,0	0,75	1969	2200	2400	2765	3600	2860	13
	28	215	2,1	0,52	1154	1249	1442	1633	3100	2420	14
	29	225	2,1	1,06	1015	1156	1085	1202	1148	663	15
	30	155	1,8	0,64	781	978	936	1016	1268	844	16
	31	260	2,8	0,88	1250	1477	1505	1420	1351	1260	43

G. Anhang

G.2. Abkürzungen:

ATP-ase	= Adenosintriphosphatase
CaBP	= calcium binding protein = Calcium bindendes Protein
cAMP	= cyclisches Adenosinmonophosphat
DPH	= 5,5, Diphenylhydantoin = Phenytoinum = Phenhydan^{R}
PTH	= Parathyreoideahormon
Vit.D_2	= Ergocalciferol = 7-Dehydrocholesterin
Vit.D_3	= Cholecalciferol = CC
25-(OH)-D_3	= 25-Hydroxy-Vit.D_3 = 25-(OH)-CC
1,25-$(OH)_2$-D_3	= 1,25-Dihydroxy-Vit.D_3 = 1,25-$(OH)_2$-CC
24,25-$(OH)_2$-D_3	= 24,25-Dihydroxy-Vit.D_3 = 24-$(OH)_2$-CC

Ca	= Calcium
K	= Kalium
Mg	= Magnesium
Na	= Natrium

H. Literatur

1. Arnold,K., Gerber,N.: The rate of decline of diphenyl hydantoin in human plasma. Clin. Pharmacol. Ther. 11, 121-134 (1970)

2. Bohlen,N., Hertl,M.: Nebenwirkungen antiepileptischer Medikamente. Deutsch. Med. Wschr. 100, 1904-1906 (1975)

3. Bowden,A.N.: Anticonvulsants and calcium metabolism. Develop. Med. Child Neurol. 16, 214-216 (1974)

4. Buddecke,E.: Grundriß der Biochemie. Walter de Gruyter u. Co, Berlin, New York, 111-115, 299 (1974)

5. Caspary,W.F.: Inhibition of intestinal calcium transport by diphenylhydantoin in rat duodenum. Naunyn-Schmiedeber's Arch. Pharmacol. 274, 146-153 (1972)

6. Christiansen,C., Rodbro,P., Munck,O.: Actions of Vitamin D_2 and D_3 and 25-OH-D_3 in anticonvulsant osteomalacia. British. Medical. Journal. 17.May. 363-365 (1975)

7. Corradino,R.A.: Diphenylhydantoin: direct inhibition of the vitamin D_3-mediatet calcium absorptive mechanism in organ-cultured duodenum. Biochemical Pharmacology, Vol.25, 863-864 (1976)

8. Crosley,C.J., Chee,C., Berman,P.H.: Rickets associated with long-term anticonvulsant therapy in a pediatric outpatient population. Pediatrics, Vol.56, 52-57 No.1 July (1975)

9. Cucinell,S.A., Koster,R., Conney,A.H., Burns,J.J.: Stimulatory effect of phenobarbital on the metabolism of diphenylhydantoin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 141, 157-160 (1963)

10. De Luca,H.F.: Vitamin D: new horisons. Clin. Orthop.

Rel. Res. 78, 4-22 (1971)

11. De Luca,H.F.: Neue Erkenntnisse über den Vit. D-Stoffwechsel. Triangel Band 12, Nr.3, 111-118 (1974)

12. De Luca,H.F., Schnoes,H.K.: Metabolism and mechanism of vitamin D. Annal. Review in Biochemistry 939, 645-648 (1976)

13. Deupree,J.D.: Evidence that diphenylhydantoin does not affect adenosine triphosphatase from brain. Neuropharmacology 15, 187-195 (1976)

14. Deupree,J.D.: The role or non-role of ATP-ase activation by phenytoin in stabilization of exzitabl membranes. Epilepsia, 18 (3), 309-315, Raven Press, New York (1977)

15. Dill,W.A., Kazenko,A., Wolf,L.M., Glazko,A.J.: Studies on 5,5-diphenylhydantoin (Dilantin^{R}) in animals and man. J. Pharmacol. Exp. Ther. 118, 270-279 (1956)

16. Dent,C.E., Richens,A., Rowe,D.J.F., Stamp,T.C.B.: Osteomalacia with longterm anticonvulsant therapy in epilepsy. Br. Med. J. 4, 69-72 (1970)

17. Dodson,W.E., Prensky,A.L., De Vivo,D.C., Goldring,S., Dodge,P.R.: Management of seizure disorders: Selected aspects. Part I. The Journal of Pediatrics, Vol.89, No.4, 527-540 Okt. (1976)

18. Ebel,J.G., Taylor,A.N., Wasserman,R.H.: Vitamin D-induced calcium binding protein of intestinal mucosa. Amer. J. Clin. Nutr. 22, 431-436 (1969)

19. Eibl,H., Lands,W.E.: Anal. Biochem. 30, 51-57 (1969)
Biochemistry 9,423-428 (1970)

20. Festoff,B.W., Appel,S.H.: Effect of diphenylhydantoin

on synaptosome sodium-potassium-ATP-ase. J. Clin. Invest. 47, 2752-2758 (1968)

21. Ferendelli,J.A., Kinscherf,D.A.: Phenytoin: Effects on calcium flux and cyclic nucleotides. Epilepsia 18 (3) 331-336 Raven Press, New York (1977)

22. Forstner,G.G., Sabesin,S.M., Isselbacher,K.J.: Rat intestinal microvillus membranes, purification and biochemical characterization. Biochem. J. 106, 384 (1967)

23. Fraser,D.R., Kodicek,E.: Regulation of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in kidney by parathyreoid hormon. Nature New Biol. 241, 163 (1973)

24. Gershon,C.D., Hepner,G.W., Brown,N., Cohen,N., Herbert, V., Janovitz,H.D.: Inhibition by diphenylhydantoin (Dilantin) of folic acid absorption in man. J. Clin. Invest. 49, 33 a (1970)

25. Gilbert,J.C., Wylle,M.G.: Effects of anticonvulsant and convulsant drugs on the ATP-ase activities of synaptosomes and their components. Br. J. Pharmacol. 56, 49-57 (1976)

26. Goodman,D.B.P., Haussler,M.R., Rasmussen,H.: Vitamin D_3 induced alteration of microvillar membrane lipid composition. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 80-86 (1972)

27. Hahn,T.J.: Bone complications of anticonvulsants. Drugs 12, 201-211 (1976)

28. Hahn,T.J., Birge,S.J., Scharp,C.R., Avioli,L.V.: phenobarbital-induced alterations in vitamin D-metabolism. J. Clin. Invest. 51, 741 (1972)

29. Hahn,T.J., Birge,S.J., Scharp,S.C., Avioli,L.V.: Vita-

min D-metabolism and phenobarbital therapy. Clin. Res. 19, 50 (1971)

30. Hahn,T.J., Haddad,J.G., Birge,S.J., Avioli,L.V.: Phenobarbital induced acceleration of vitamin D-metabolism. J. Clin. Invest. 49, 39 a (1970)

31. Hahn,T.J., Scharp,C.R., Avioli,L.V.: Effect of Phenobarbital (PB) administration on subcellular distribution of D_3-H^3 in rat liver. Clin. Res. 20, 547 (1972)

32. Hansen,J.M., Kristensen,M., Skovsted,L., Christensen,L. K.: Dicumarol induced diphenylhydantoin intoxication. Lancet 2, 265-266 (1966)

33. Hansen,J.M., Kristensen,M., Skovsted,L.: Sulthiame (Ospolot^R) as inhibitor of diphenylhydantoin metabolism. Epilepsia 9, 17-22 (1968)

34. Haussler,M.R., Nagode,L.A., Rasmussen,H.: Induction of intestinal brush border alkaline phosphatase by vitamin D and identity with Ca-ATP-ase. Nature 228, 1199-1201 (1970)

35. Hepner,G.W., Aledort,L.M., Gershon,C.D., Cohen,N., Herbert,V., Janowitz,H.D.: Inhibition of intestinal ATP-ase by diphenylhydantoin and acetolamide. Clinical Research 18, 382 (1970)

36. von Herrath,D., Kraft,D., Schaefer,K., Koeppe,P.: Influence of phenobarbital and diphenylhydantoin on vitamin D-metabolism and calcium retention in rats. Res. Exp. Med. 158, 194 (1972)

37. Holdsworth,E.S.: The effect of Vitamin D on enzyme activities in the mucosal cells of the chick small intestine. J. Membrane Biol. 3, 43-53 (1970)

38. Huldschinsky,K.: Heilung von Rachitis durch künstliche

Höhensonne. Deutsch. Med. Wochschr. 45, 712-713 (1919)

39. Jubitz,W., Haussler,M.R., Mc Cain,T.A., Tolman,K.G.: Plasma 1,25-dihydroxy vitamin D levels in patients receiving anticonvulsant drugs. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Vol.44, No.4, 617-621 April (1977)

40. Kater,R.M.H., Roggin,G., Tobon,F., Zieve,P., Iber,F.L.: Am. J. Med. Sci. 258, 35 (1969)

41. Koch,H.U., Kraft,D., von Herrath,D., Schaefer,K.: Influence of diphenylhydantoin and phenobarbital on intestinal calcium transport in the rat. Epilepsia 13, 829 (1972)

42. Kraft,D., Schaefer,K., Bochentin,W., von Herrath,D., von Opitz,A., Koeppe,P.: Untersuchungen zum Calciumstoffwechsel bei antiepileptischer Therapie. Nervenarzt 44, 150 (1973)

43. Krause,K.-H., Prager,P., Schidt-Gayk,H., Ritz,E.: Diagnostik der Osteopathia antiepileptica im Erwachsenenalter. Dtsch. Med. Wschr. 102, 1872-1877 (1977)

44. Krawitt,E.L., Stubbert,P.A., Ennis,P.H.: Calcium absorption and brush border phosphatase following dietary calcium restriction. American Journal of Physiology Vol.224, No.3, 548-551, March (1973)

45. Krawitt,E.L.: Ethanol inhibits intestinal calciumtransport in rats. Nature Vol.243, 88-89 No.11 May (1973)

46. Krawitt,E.L.: Effect of ethanol ingestion on duodenal calcium transport. Journal of Laboratory and Clinical Medicine St. Louis Vol.85, No.4, 665-671 April (1975)

47. Kruse,R.: Osteopathien bei antiepileptischer Langzeittherapie. Monatschr. Kinderheilk. 116, 378-381 (1968)

48. Kruse,R.: Osteopathien unter antiepileptischer Langzeittherapie. Wissenschaftl. Beiblatt zur Materia Medica Nordmark, Nr.68, 6-8 (1975)

49. Kutt,H., Wolk,M., Scherman,R., Mc Dowell,F.: Insufficient parahydroxylation as a cause of diphenylhydantoin toxicity. Neurology (Minneap.) 14, 542-548 (1964)

50. Kutt,H., Winters,W., Mc Dowell,F.: Depression of parahydroxylation of diphenylhydantoin by antituberculosis chemotherapy. Neurology (Minneap.) 16, 594-602 (1966)

51. Lifshitz,F., Maclaren,N.K.: Vitamin D-dependent rickets in institutionalized, mentally retarded children receiving long-term anticonvulsant therapy. Part I: A survey of 288 patients. Pediatrics Vol.83, No.4, 612-620 Okt. (1973)

52. Livingston,S., Berman,W.: Antiepileptic drugs and development of rickets. J. Pediatr. 82, 347 (1973)

53. Livingston,S., Pauli,L.L.: Anticonvulsants and Vitamin D metabolism. Develop. Med. Child Neurol. 16, 683-684 (1974)

54. Lowry,O.H., Roerrough,N.J., Farr,A.L.: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

55. Luckert,B.P., Adams,J.S.: Effect of anticonvulsants on Ca- and P-Homöostasis. The New England Journal of Medizine June 5 1244 (1975)

56. Lücking,Th., Delling,G.: Schwere rachitische Osteopathie bei antiepileptischer Langzeitbehandlung. Dtsch. Med. Wschr. 98, 1036-1040 (1973)

57. Lunde,P.K.M., Anders,R., Yaffe,S.J., Lund,L., Sjoqvist, F.: Plasma protein binding of diphenylhydantoin in man. Interaction with other drugs and the effect of tempe-

rature and plasma dilution. Clin. Pharmacol. Ther. 11, 846-855 (1970)

58. Maclaren,N., Lifshitz,F.: Vitamin D-dependent rickets in institutionalized mentally retarded children on long-term anticonvulsant therapy. Part II: The response to 25-hydroxycholecalciferol and to vitamin D_2. Pediat. Res. 7, 914-922 (1973)

59. Martin,D.L., De Luca,H.F.: Influence of sodium on calcium transport in the rat small intestine. Am. J. Physiol. 216, 1351-1359 (1969)

60. Martin,D.L., Melancon,M.J.JR., De Luca,H.F.: Vitamin D stimulated, calcium dependent adenosine triphosphatase from brush border of rat small intestine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 819-823 (1969)

61. Mather,K.: Statistical analysis in Biology. New York, Interscience, chapter 5 (1947)

62. Mc Collum,E.V., Simmonds,N., Shipley,P.B., Park,E.A.: Studies on experimental rickets. VIII. The production of rickets by diets low in phosphorus and fat. J. Biol. Chem. 47, 507-519 (1921)

63. Melancon,M.J.JR., De Luca,H.F.: Vitamin D stimulation of calcium dependent adenosine triphosphatase in chick intestinal brush borders. Biochemistry 9, 1658-1664 (1970)

64. Melsen,F., Moskilde,L., Christensen,M.S., Lund,B., Sørensen,O.H.: Interrelationships between serum 25-hydroxycholecalciferol, serum parathyreoid hormone and morphometric bone chanes in anticonvulsant osteomalacia. Therapeutic effect of Vitamin D_2. Acta Endocrinologica, 84, 473-478 (1977)

65. Moriuchi,S., De Luca,H.F.: The effect of Vitamin D_3 me-

tabolites on membrane proteis of chick duodenal brush borders. Archives of Biochemistry and Biophysis 174, 367-372 (1976)

66. Mosekilde,L., Christensen,M.S., Lund,B., Sørensen,O.H., Melsen,F.: The Interrelationships between serum 25-hydroxycholecalciferol, serum parathyreoid hormon and bone changes in anticonvulsant osteomalacia. Acta Endocrinlogica 84, 559-565 (1977)

67. Münch,U.H., Lupi,G., Kistler,H.J.: Osteomalazie und Antiepileptika: Beitrag zur Pathogenese. Schweiz. Med. Wschr. 105, Nr.19, 608-615 (1975)

68. Noach,E.L., van Rees,H.: Intestinal distribution of intravenously administered diphenylhydantoin in the rat. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 150, 52-61 (1964)

69. von Nolte,R., Brügmann,G., Besch,W.: Antiepileptische Therapie mit Diphenylhydantoin unter Serumspiegelkontrolle im Kindesalter, Klinische Erfahrungen. Wissenschaftl. Beiblatt zur Materia Medica Nordmark Nr.68, 13-14 (1975)

70. Omdahl,J.L., De Luca,H.F.: Regulation of vitamin D metabolism and function. Physiological Reviews Vol.53, No.2, 327-340, April (1973)

71. Pflanzagl,J.: Allgemeine Methodenlehre der Statistik. Band II, 3. Auflage, Berlin 1968

72. Piazolo,P.: Calcium-bindendes Protein beim Nierengesunden und Niereninsuffizienten Menschen. Habilitationsschrift, Ulm (1973)

73. Prader,A.: Editorial: Neues über Vitamin D: Stoffwechsel, aktive Endprodukte, analoge Verbindungen, therapeutische Ausblicke. Helv. pädiat. Acta 30, 111-119 (1975)

74. Reynolds,E.H., Hallpike,J.F., Philips,B.M., Matthews, D.M.: Reversible, absorptive defects in anticonvulsant megaloblastic anaemia. J. Clin. Path. 18, 593 (1965)

75. Ribot,C., Geraud,G., Castignol,M., Dero,M., Geraud,J., Boulard,C.: Ostéomalacie des anticonvulsivants. Intérét du dosage plasmatique de la 25 Hydroxy-vitamine D dans une population d'épileptiques. Annales d'Endocrinologie (Paris) 37, 483-484 (1976)

76. Richens,A., Rowe,D.J.F.: Disturbance of calcium metabolism by anticonvulsant drugs. Br. Med. J. 4, 73-76 (1970)

77. Rietbrock,N.: Pharmakokinetik von Diphenylhydantoin nach einmaliger und wiederholter Applikation. Wissenschaftl. Beiblatt zur Materia Medica Nordmark Nr.68, 9-10 (1975)

78. Rosenberg,J.H., Godwin,H.A., Streiff,R.R., Castle,W.B.: Impairment of intestinal deconjugation of dietary folate. Apossible explanation of the megaloblastic anaemia associated with phenytoin tratment. Lancet II, 530-533 (1968)

79. Sampson,H.W., Matthews,J.L., Martin,J.H., Kunin,A.S.: An electron microscopic localization of calcium in the intestine of normal, rachitic and vitamin D-treated rats. Calcified Tissue Res. 5, 305-316 (1970)

80. Sandritter,W., Beneke,G.: Allgemeine Pathologie F.K. Schattauer Verlag-Stuttgart-New York (1974)

81. Schachter,D., Kowarski,S., Finkelstein,J.D.: Tissue concentration differences during active transport of calcium by intestine. Am. J. Physiol. 211, 1131-1136 (1966)

82. Schachter,D., Dowdle,E.B., Schenker,H.: Aktive absorp-

tion of calcium by the small intestine of the rat. Am. J. Physiol. 198, 263-268 (1960)

83. Schaefer,K., Flury,W.H., von Herrath,D., Kraft,D., Schweingruber,R.: Vitamin D Stoffwechsel und Antiepileptika. Schweiz. Med. Wochenschrift Nr.23, 785-791, 102. Jahrgang Juni (1972)

84. Schaefer,K., von Herrath,D., Kraft,D.: Calciumstoffwechselstörungen bei antiepileptischer Therapie. Deutsche Med. Wochenschrift Nr. 20, 1043-1046, 98. Jahrgang Mai (1973)

85. Schäfer,H.J.: Ultrasructure and ion distribution of the intestinal cell during experimental vitamin D deficiency rickets in rats. Virchows Arch. Abt. A 359, 111 (1973)

86. Schedl,H.P., Osbaldiston,G.W., Mills,J.H.: Absorption, secretion and precipitation of calcium in the small intestine of the dog. Am. J. Physiol. 214, 814-819 (1968)

87. Schmid,F.: Osteopathien bei antiepileptischer Dauerbehandlung. Fortschr. Med. 85, 381 (1967)

88. Schmidt,D.: Effect of ethanol intacke on phenytoin metabolism in volunteers. Separatum Experientia 31, 1313 (1975)

89. Seifert,G., Schäfer,H.J., Schulz,A.: Die Bedeutung des intrazellulären Calciumtransportes für die Zellfunktion. Deutsche Medizinische Wochenschrift 100, 1854-1862 (1975)

90. Silver,J., Neale,G., Davies,D., Breckenridge,A., Thompson,G.R.: The effect of phenobarbitone-induction on vitamin D metabolism. Clin. Sci. 42, 12 (1972)

91. Silver,J., Thompson,G.R., Neale,G., Cameron,J.D.,

Orme,M., Davies,D., Breckenridge,A.: Increased rate of metabolism of vitamin D_3 in phenobarbitone-induced rats. In: Taylor,S. (ed.): Endocrinology, 477 (1971)

92. Stamp,T.C.B.: Effects of longterm anticonvulsant therapy on calcium and vitamin D metabolism. Proc. Roy. Soc. Med. 67, 64 (1974)

93. Stanbury,S.W.: Osteomalacia. Clin. Endocrinol. Metabol. 1, 239 (1972)

94. Swoboda,W.: Vitamin D - ein altes Vitamin Cholecalciferol - ein neues Hormon. Pädiat. Prax. 17, 205-212 (1976)

95. Tolman,K.G., Jubiz,W., Sannella,J.J., Madsen,J.A., Belsey,R.E., Goldsmith,R.S., Freston,J.W.: Osteomalacia associated with anticonvulsant drug therapy in mentally retarded children. Pediatrics Vol. 56, No.1, 45-51 (1975)

96. Urban,E., Scedl,H.P.: Comparision of in vivo and in vitro effects of vitamin D in calcium transport in the rat. Am. J. Physiol. 217, 126-130 (1969)

97. von der Waerden,B.L.: Mathematische Statistik. Berlin (1967)

98. Walling,M.W., Rothman,S.S.: Phosphate indipendent, carrier-mediated active transport of calcium by rat inteltine. Am. J. Physiol. 217, 1144-1148 (1969)

99. Warner,R.R., Coleman,J.R.: Electron probe analysis of calcium transport by small intestine. J. Cell. Biol. 64, 54 (1975)

100. Wasserman,R.H.: Interaction of vitamin D dependent calcium binding protein with lysolecithin: Possible relevance to calcium transport. Biochem. Biophys. Acta 203,

176-179 (1970)

101. Wasserman,R.H., Taylor,A.N.: Vitamin D_3-induced calcium binding protein in chick intestinal mucosa. Science 152 791 (1966)

102. Wasserman,R.H.: Calcium transport by the intestine: a model and comment on vitamin D action. Calcified Tissue Res. 2, 301-313 (1968)

103. Wasserman,R.H., Taylor,A.N.: Die physiologische Bedeutung des Vitamin D-abhängigen calciumbindenden Proteins. Triangel Band 12, Nr.3, 119-127 (1974)

104. Weber,E.: Grundriß der biologischen Statistik. 6. Auflage Stuttgart (1968)

105. Wensel,R.H., Rich,C., Brawn,A.C., Volwiler,W.: Absorption of calcium measured by incubation and perfusion of intact human small intestine. J. Clin. Invest. 48, 1768-1775 (1969)

106. Wilensky,A.J., Lowden,J.A.: The inhibitory effect of diphenylhydantoin on microsomal ATP-ase. Live Sdience Vol.11, Part II, 319-327 (1972)

107. Wilson,T.H.: Intestinal absorption. Saunders, Philadelphia (1962)

108. Windaus,A., Schenck,F., von Werder,F.: Über das antirachitische Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydro-Cholesterin. Z. Physiol. Chem. 241, 100-103 (1936)

109. Windorfer,A., Sauer,W.: Drug interactions during anticonvulsant therapy in childhood: Diphenylhydantoin, Primidone, Phenobarbitone, Clonacepam, Nitrazepam, Carbamazepin and Diprophylacetate. Sonderdruck aus Neuropädiatrie 8, 29-41 (Hippokrates Verlag Stuttgart) (1977)

110. Winnacker,J.L., Yeager,H., Saunders,J.A., Russell,B., Anast,C.S.: Rickets in children receiving antivonvulsant drugs. Am. J. of Diseases of Children, 3, Vol.131, 286-290 (1977)

111. de Wolff,F.A.: Stimulation of vitamin D-dependent Ca-ATP-ase and of intestinal calciumabsorption by diphenylhydantoin. European Journal of Pharmacology, 33, 71-79, (1975)

112. Woodbury,D.M., Pentry,J.K., Schmidt,R.P.: Antiepileptic Drugs. Raven Press. New York

Herrn Professor Dr. med. h.c. J. Ströder, Direktor der Kinderuniversitätsklinik Würzburg danke ich für die Vergabe dieser Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Übernahme des Referates.

Herrn Professor Dr. med. K. Sandhage danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. F. Thanner danke ich für seine Unterstützung in Aufbau und Durchführung des experimentellen, methodischen Teiles dieser Arbeit sowie für seine Beratung und Anregungen in wissenschaftlich theoretischen Fragen.

Frau Dr. Haubitz danke ich für die Unterstützung und Einarbeitung in die statistische Auswertung am Rechenzentrum der Universität Würzburg.

Lebenslauf

Am 25.Juli 1950 wurde ich als drittes von fünf Kindern meiner Eltern Johanna geb. Knapp und Gotthold Mergner, von Beruf Forstrat, in Schernfeld Kreis Eichstätt geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Grundschule wechselte ich in das humanistische Gymnasium zu Lohr am Main über, an dem ich im Jahr 1969 das Zeugnis der Reife erlangte.
Anschließend war ich für acht Wochen in der Inneren und Gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung des Kreiskrankenhauses Lohr krankenpflegerisch tätig.

Im Wintersemester 1969 begann ich an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg das Studium der Medizin. Während der vorklinischen Semester nahm ich an den Vorlesungen und Kursen des medizinisch-psychologischen Institutes sowie an Veranstaltungen der Philosophischen Fakultät teil.

Am 1. August 1973 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab und famulierte daraufhin sechs Wochen in den Abteilungen für Innere Medizin und Chirurgie am Kreiskrankenhaus Gemünden.

Im Jahr 1974 arbeitete ich drei Monate im Labor des Departements of pathology der University of Maryland in Baltimore und beteiligte mich damit an einer Studie über die Veränderung der respiratorischen Parameter an ischämischem Nierengewebe.

Im Wintersemester 1975 begann ich mit dem experimentellen Teil meiner Dissertationsarbeit an der Kinderuniversitätsklinik Würzburg.

In den Sommersemesterferien 1975 famulierte ich acht Wochen an der psychosomatischen Klinik Bad Herrenalb.

Am 24.Januar 1977 beendete ich die ärztliche Prüfung.
Vom 16.Mai 1977 bis 15.Januar 1978 war ich an der Chirurgischen Klinik der Krankenanstalten Sarepta in Bielefeld

Bethel als Medizinalassistentin tätig.
Daraufhin widmete ich mich dem theoretischen Teil meiner Dissertationsarbeit.

Meine Pflichtmedizinalassistentenzeit in der Inneren Medizin leistete ich an der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg ab vom 01.1o.1978 bis 31.01.1979.

Seit dem 19.03.1979 arbeite ich als Assistenzärztin an der Abteilung für Anästhesie und Intensivpflege des Evangelischen Krankenhauses Lippstadt.

Christine Merguer

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80